

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Determinación de células tumorales circulantes como factor  
pronóstico y detector de recidiva en carcinoma broncogénico  
no microcítico**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Lucía Milla Collado**

**Directores**

**Florentino Hernando Tranco**  
**José Ramón Jarabo Sarceda**  
**José Luis González Larriba**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



Determinación de células tumorales circulantes como  
factor pronóstico y detector de recidiva en  
carcinoma broncogénico no microcítico.

Tesis doctoral de Lucía Milla Collado.

Directores:

Dr. Florentino Hernando Tranco

Dr. José Ramón Jarabo Sarceda

Dr. José Luis González Larriba

Hospital Universitario Clínico San Carlos.

Servicio de Cirugía Torácica. Servicio Oncología Médica.

Madrid, 2019.



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Lucía Milla Collado

con número de DNI/NIE/Pasaporte 47064765a, estudiante en el Programa  
de Doctorado Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas,  
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Determinación de células tumorales circulantes como factor pronóstico  
y detector de recidiva en carcinoma broncogénico no microcítico.

y dirigida por: Dr Florentino Hernando Tranco, Dr José Ramón Jarabo Sarceda  
Dr José Luis González Larriba

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 23 de mayo

de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

## *INFORME de los DIRECTORES*

D. Florentino Hernando Tranco, Jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico San Carlos y Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid. D. José Luis González Larriba, Catedrático y Jefe de Sección de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos. D. José Ramón Jarabo Sarceda, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid.

Certifican:

Que Dña. Lucía Milla Collado ha realizado, bajo su dirección, el trabajo titulado “Determinación de células tumorales circulantes como factor pronóstico y detector de recidiva en carcinoma broncogénico no microcítico” para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad, interés científico y rigor metodológico necesarios y, por tanto, avalan su presentación para ser juzgado.

Para que conste, firman el presente certificado en:

Madrid 2019-05-06

D. Florentino Hernando Tranco

D. José Luis González Larriba

D. José Ramón Jarabo Sarceda

A vosotros, los ausentes,  
por vuestra eterna compañía.

# ***AGRADECIMIENTOS***

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a todos los pacientes que se ofrecieron de forma completamente altruista para formar parte de este estudio. Sin su generosidad y la de otros muchos, los avances no serían posibles.

A todo el personal sanitario que colaboró voluntariamente en el reclutamiento de pacientes y en la recogida de muestras, especialmente al personal de Oncología Médica y Cirugía Torácica.

A mis directores, por vuestros consejos y ayuda en la redacción de esta tesis, todo habría sido mucho más difícil sin vuestro apoyo.

A los adjuntos del Servicio de Cirugía Torácica, no solo por haber colaborado en la recolección de muestras de este estudio, sino también por haberme ayudado en mi formación como especialista.

A mis residentes pequeños, “mis pollitos”, porque sin vuestra iniciativa y ayuda en terminar la recogida, el estudio se habría quedado cojo. Pero sobre todo, gracias por haber estado ahí durante la residencia; todo fue muchísimo más fácil y llevadero a vuestro lado.

A las maravillosas investigadoras del laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos. Gracias por vuestra paciencia y vuestros ánimos, sobre todo al inicio del trabajo. Os merecéis mucho más reconocimiento del que se os da.

A Teresa, por tu inifinita paciencia con el estudio estadístico. Gracias por haberme ayudado tanto y respondido a tantas y tantas preguntas.

A la Sociedad Española de Cirugía Torácica y a la Fundación Mutua Madrileña por haber confiado en este proyecto y haber ofrecido su ayuda económica.

A mis padres, siento que no podamos compartir este momento pero tengo claro que sin vuestro esfuerzo y empuje yo nunca habría llegado hasta aquí.

Sois los responsables de todo esto. Os extraño.

A Charlie, gracias por estar a mi lado, por ser mi apoyo, por no desistir en tu insistencia. Gracias no solo por la ayuda “científica”, sino por la ayuda en todo.

A mi familia, por vuestro apoyo en los momentos difíciles.

A mis amigas, que vuestras conversaciones me sigan sacando sonrisas hasta en los peores días. No cambiéis.

A todos con los que he compartido experiencia laboral, porque por unas cosas u otras me habéis hecho como soy.



# ***ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS***

## *ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS*

<sup>18</sup>F-FDG: 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-desoxi-D-glucosa.

ACS: American Cancer Society.

ADNct: ADN circulante tumoral.

AJCC: American Joint Commission on Cancer.

ARNc: ARN circulante.

CPCP: Carcinoma Pulmón Célula Pequeña.

CPNCP: Carcinoma Pulmón No Célula Pequeña.

CCR: Cáncer Colorrectal.

CP: Cáncer de Pulmón.

CTC: Célula Tumoral Circulante.

CTM: Circulating Tumor Microemboli.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

EBUS: Endobronquial Ultrasound.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

EpCAM: Anticuerpos frente a la molécula de adhesión de la célula epitelial.

ESCAPE: European Study of Cohorts for Air Pollution Effects.

EUS: Endoesophageal ultrasound.

FBC: Fibrobroncoscopia.

FDA: Food and Drug Administration.

FMM: Fundación Mutua Madrileña.

GECP: Grupo Español de Cáncer de Pulmón.

Gy: Gray.

HR: Hazard Ratio.

IALT: International Adjuvant Lung Cancer Trial.

IARC: Agency for Research on Cancer.

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer.

ITK: Inhibidor Tirosin-Kinasa.

LACE: Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation.

M1: primera muestra sanguínea.

M2: segunda muestra sanguínea.

M3: tercera muestra sanguínea.

MR: muestra sanguínea de recidiva.

NCCN: National Comprehensive Cancer Network.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PD-L1: Programmed Death Ligand 1.

PET: Tomografía por Emisión de Positrones.

QT: Quimioterapia.

RT: Radioterapia.

RxTX: Radiografía Tórax.

R0: Resección completa.

R1: Resección incompleta.

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.

SG: Supervivencia Global.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SG: Supervivencia Global.

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.

SLP: Supervivencia Libre de Progresión.

SUVmax: valor máximo de captación.

TAC: Tomografía Axial Computerizada.

TBC: Tuberculosis.

TEM: Transición Epitelio-Mesenquimal.

# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>27</b>
Estado actual del cáncer de pulmón	28
Factores de riesgo del cáncer de pulmón	29
La evolución del proceso diagnóstico del cáncer de pulmón	31
Clasificación histológica cáncer broncogénico de célula no pequeña	36
Clasificación TNM	39
Tratamiento según estadio	41
Carcinoma de pulmón célula pequeña	48
Células tumorales circulantes	50
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>64</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>67</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>69</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>71</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>90</b>
Resultados globales en relación a CTCs	104
Resultados por grupos	109
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>135</b>
Descripción de grupo	136
Metodología de la extracción de muestras sanguíneas	139
Diferencias técnicas entre los distintos dispositivos	143
Relación de las CTCs con variables sociodemográficas	146
Relación de las CTCs con variables tumorales	146
Supervivencia de la muestra global en relación con la presencia de CTCs	147
Utilidad de las CTCs en estadios precoces	148
Utilidad de las CTCs en estadios avanzados	152
Comparativa con otra tecnología: ADN circulante tumoral	157
Limitaciones del estudio	162
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>165</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>168</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>173</b>
---------------------------	------------

## ***RESUMEN***

## *RESUMEN*

### Introducción

La alta tasa de mortalidad del cáncer de pulmón hace necesario la investigación de herramientas que pudieran mostrar interés pronóstico, como la determinación de CTCs, y que pudieran ayudar en decisiones terapéuticas y en el seguimiento.

Las CTCs son células malignas liberadas desde el tumor primario y desde las metástasis al torrente sanguíneo, con supuesta capacidad metastatizante.

En 1869, el Dr Ashworth realizó la primera descripción tras hallar células tumorales similares al tumor primario en la circulación de un paciente metastásico. Desde entonces, más de 50 dispositivos han sido desarrollados para detectar y aislar CTCs, cada uno con diferente metodología y resultados.

### Objetivos

El principal objetivo del estudio es analizar si la presencia de CTCs en sangre periférica de pacientes con CPNCP tiene influencia en la SG y en la SLE/SLP.

### Material y Métodos

Se diseñó un estudio observacional analítico de cohortes prospectivas sin grupo control, cuyo reclutamiento se centró en pacientes diagnosticados de



CPNCP de Cirugía Torácica y Oncología Médica.

Se determinaron dos grupos:

- 1º: pacientes intervenidos con intención curativa en estadios IA-IIIA.
- 2º: pacientes en estadios IIIB-IV con tratamiento oncológico.

El reclutamiento de pacientes se realizó desde Abril de 2010 hasta Octubre de 2013.

Todos los pacientes incluidos fueron diagnosticados de CPNCP, mayores de 18 años y tras firmar el consentimiento informado. Se excluyeron pacientes con antecedentes oncológicos, sin resección completa, no subsidiarios de quimioterapia o ausencia de alguna muestra.

Se recogieron las variables sociodemográficas, las relacionadas con la intervención quirúrgica, con el tumor, con el seguimiento y con la determinación de CTCs.

En el caso de los pacientes en estadios precoces, las extracciones de sangre se realizaron antes de la cirugía, a los 12 meses, a los 24 meses y en el momento de la recidiva si se produjera.

En pacientes en estadio avanzado, las muestras se extrajeron previo al primer ciclo de QT y la segunda tras este primer ciclo.

Todas las muestras se conservaron en tubos Cellsaver® y se analizaron con el sistema CellTrack® AutoPrep System. La obtención de las imágenes generadas a través de microscopía electrónica en el CellTracks Analyzer II fueron interpretadas por dos investigadores.

Se realizó el análisis de la distribución de las variables sociodemográficas y tumorales según la presencia de CTCs. Para el análisis de supervivencia, se

utilizó el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se examinaron por el método de Long-Rank.

## Resultados

Se reclutaron 89 pacientes diagnosticados de CPNCP, de los que 36 fueron excluidos. Finalmente 53 pacientes fueron incluidos, 28 en el grupo de estadios precoces y 25 en avanzados. La mortalidad global fue de 54,7 % y la relacionada con el cáncer se presentó en 17 casos.

La mediana de SG de los 53 pacientes fue de 28 meses y la SLE de 17 meses. La mediana de SG en el grupo de avanzados fue de 10 meses y su SLP de 7 meses.

La mediana de SG y de SLE en el grupo de pacientes en estadios precoces no se alcanzaron.

### *Estadios avanzados*

Se extrajeron 25 M1 y 25 M2.

Las curvas de SG y SLP en relación a las CTCs en M1 no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La mediana de SG fue de 6 meses vs 11 meses y la de SLP de 6 meses vs 7 meses.

La mediana de SG en pacientes sin CTCs en M2 fue de 19 meses y con CTCs de 5 meses, presentando diferencias estadísticamente significativas en la curva ( $p=0,006$ ). Los pacientes con M2 presentaron peor SLP (4 meses vs 8 meses) pero sin diferencias estadísticamente significativas.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de SG de los pacientes en los que se observó un descenso en CTCs entre la M2 y la M1 y los que no ( $p=0,854$ ). La mediana de SG fue de 6 meses en

pacientes sin descenso en el número de CTCs, y de 11 meses en los que sí se redujeron.

Las curvas de SLP no variaban significativamente en función de las modificaciones de CTCs entre las dos muestras extraídas ( $p=0,649$ ).

### *Estadios precoces*

Se reclutaron 28 pacientes. Se extrajeron 28 M1, 21 M2, 20 M3 y 9 MR.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con CTCs en M1 en relación a SG.

Los pacientes con CTCs en M1 no presentaron peor curva de SLE ( $p=0,822$ ).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la curva de SG entre los pacientes con y sin CTCs en M2 ( $p=0,446$ ).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la curva de SLE entre los pacientes con CTCs en M2 y los que no presentaron ( $p=0,168$ ).

El aislamiento de CTCs en M3 no determinó una curva de SG peor que en su ausencia ( $p=0,229$ ).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de SLE de los grupos con y sin aislamiento de CTCs en M3 ( $p=0,832$ ).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las curvas de SG en relación a CTCs en MR ( $p=0,581$ ).

Todos los pacientes a los que se extrajo MR presentaron una mediana de SLE de 10 meses, sin importar la presencia de CTCs.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que presentaron disminución del número de CTCs entre sus diferentes muestras y la SG y la SLE.

## Conclusiones

En nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables tumorales pronósticas clásicas y la presencia de CTCs en la M1 en ambos grupos.

En el grupo de estadios avanzados, la M1 no mostró diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a pronóstico de la enfermedad. La presencia de CTCs en la M2 sí que determinó una SG más corta. Esta diferencia no se observó en relación a la SLP. En relación a las variaciones del número de CTCs, tampoco se observaron diferencias significativas respecto a la SG y SLP.

En el grupo de estadios iniciales, la presencia de CTCs en las muestras extraídas en todo el proceso o la variación en su número, no se revelaron como factores pronósticos en relación a la SG o SLE.

El alto número de pacientes en los que no se han hallado CTCs puede estar relacionado con el método CellSearch usado, no detectando aquellas CTCs que no presentaron marcadores epiteliales.

## ***SUMMARY***

## *SUMMARY*

### Introduction

This high mortality rate of lung cancer requires the investigation of tools that could show prognostic interest, such as the determination of CTCs, and that could help us with therapeutic decisions and follow-up patterns.

### *CTC Status*

Circulating tumor cells (CTCs) are malignant cells released from primary tumor or from metastases to the bloodstream with metastatic potential.

In 1869, Dr. Ashworth made the first description after isolating bloodstream tumor cells similar to primary tumor's cells in a metastatic cancer patient. Since then, more than 50 devices have been developed for identification and isolation of this kind of cells, each one based on different technology and providing different results.

### Aim

The main objective of our research is to determine if the presence of CTC in NSCLC patient's bloodstream determines a different overall survival, disease free survival or progression free survival.

### Material and Methods

An analytical observational not-controlled study of prospective cohorts was designed. Recruitment was composed of NSCLC patients attended at the Thoracic Surgery and Oncology Departments.

Two different groups were determined:

- First group: patients operated with curative intent in stages IA-IIIa.

- Second group: patients in stages IIIB-IV with oncological treatment.

The recruitment of patients was carried out from April 2010 to October 2013.

All the included patients were diagnosed with NSCLC, older than 18 years and after signing the informed consent. The excluded patients were those with oncological antecedents, without complete resection, not subsidiary of chemotherapy or absence of any samples.

Recorded variables were all those referred to demographic data, intervention, tumor aspects, follow up data and the isolation of CTCs.

In the case of patients in early stages, blood draws were performed before surgery, at 12 months, at 24 months and at the time of recurrence if it occurred.

In patients in advanced stage, the samples were extracted before the first cycle of QT and the second sample after this first cycle.

Every samples were preserved in Cellsaver® pipes and were analized with CellTrack® AutoPrep System. Electroninc microscope images obtained with CellTracks Analyzer II were analyzed by two different investigators.

The relationship among CTCs and demographic and tumor variables was stablished. Survival analysis was done following Kaplan-Meier curves. Survival curves´differences were determined usgin log Rank test.

## Results

There were recruited 89 NSCLC patients, 36 of whom were excluded. At the end of study 53 patients were included, 28 in the early stage group and 25 in the advanced stage group. Overall mortality was 54.7% and cancer-related mortality happened in 17 cases (32.1%).

Median OS of the 53 patients was 28 months and DFS of 17 months. Median OS in advanced stage patients was 10 months and median DFS 7 months. In the early stage group the median OS and DFS were not reached.

#### *Advanced stages*

First samples (S1) and second samples (S2) were obtained in the whole sample.

The OS and PFS curves in relation to the CTCs in S1 did not show statistically significant differences. The median OS was 6 months vs 11 months and median of PFS was 6 months vs 7 months.

Median OS in patients in whom no CTCs isolation at S2 happened was 19 months in comparison to 5 months in those who presented them. OS curves showed statistically significant differences this time ( $p=0.006$ ).

Patients with CTCs in S2 showed worse median PFS, 4 months vs 8 months but no statistically significant differences.

OS curves showed no significant differences among patients with a decreased number of CTCs between S2 and S1 ( $p=0.854$ ). Median OS was 6 months in patients without decreasing in CTCs number compared to 11 months in those who presented such decrease.

PFS did not show any significant variation in relation to variation of CTCs between both samples ( $p=0.649$ ).

#### *Early stages*

A total of 28 patients were recruited; available samples from these patients are 28 S1, 21 S2, 20 third samples (S3) and 9 samples of recurrence (SR).

No statistically significant differences were observed in patients with or without CTCs isolation in S1 concerning OS.



Patients with CTCs in S1 did not present a worse DFS curve ( $p=0.822$ ).

No statistically significant differences were found in the SG curve between patients with and without CTCs in S2 ( $p = 0.446$ ).

No statistically significant differences were found in DFS curves of patients with or without CTCs in S2 ( $p=0.168$ ).

CTCs isolation in S3 has no impact in OS curve ( $p=0.229$ ). No impact was either found concerning DFS ( $p=0.832$ ).

Those patients who presented disease recurrence and SR was obtained and positive for CTCs isolation had a 23 months OS. Patients without CTCs in SR did not reach this median OS. No statistically significant differences were found in OS curves ( $p=0.581$ ).

Every patient in whom SR was obtained presented a median DFS of 10 months, irrespective to CTCs isolation.

No statistically significant differences were found between patients with a decrease in CTCs number among different samples in relation to OS and DFS.

## Conclusions

In our study we did not find significant differences of the distribution of classic tumoral prognostic variables and CTCs isolation in S1 in both groups.

In advanced stage group S1 did not show any prognostic impact. CTCs isolation in S2 was associated with a shorter OS. This difference was not confirmed in PFS. CTCs count variations did not either show any impact on OS nor PFS.

In early stage group, no implications in prognosis were found related to CTCs;

nor their presence or variation in number during follow-up impacted OS or DFS.

The high number in whom we were not able to isolate CTCs might be related with CellSearch method employed in our study, which is unable to detect those CTCs without expression of epithelial markers.

# ***INTRODUCCIÓN***

# *INTRODUCCIÓN*

## **Estado actual del cáncer de pulmón**

A pesar de los avances tanto diagnósticos como terapéuticos, el cáncer de pulmón (CP) continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, provocando 1,3 millones de fallecimientos anuales. Cada año se diagnostican casi dos millones de nuevos casos en todo el mundo (1).

En Estados Unidos (EEUU), la American Cancer Society estimaba que en 2018 se producirían 234.030 nuevos diagnósticos de CP. Si categorizamos por género, 112.350 corresponderán a mujeres y 121.680 hombres. La mortalidad para el año 2018 se estima en 154.050 casos, 83.550 fallecimientos en varones y 70.500 en mujeres (2). Aunque la incidencia y mortalidad en hombres sigue siendo superior que en mujeres, se ha observado un aumento progresivo entre el sexo femenino.

Centrándonos en nuestro contexto demográfico, en España se realizan más de 28.300 diagnósticos nuevos al año de CP y fallecen más de 22.100 individuos por esta causa. La mortalidad acumulada en los últimos 20 años en nuestro país asciende a 400.000 casos (3).

En el año 2016 el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) informó del aumento de mortalidad por CP respecto a 2015, un 2,6%. Este porcentaje traducido a números absolutos equivale 22.155 fallecidos más por año, lo que supone más de 60 fallecimientos diarios (3).

El dato más llamativo es el incremento de muertes entre las mujeres, que se ha multiplicado por tres en las últimas dos décadas. En 1996, el número de fallecidas fue de 1.568, incrementándose hasta 2.634 en 2006 y manteniéndose en continuo aumento hasta 2016 con un número total de

muertes entre la población femenina de 4.557 en ese año (3).

Aunque de forma menos significativa, también se ha registrado un aumento en los fallecimientos entre varones de un 4,2% entre 2006 y 2016.

La magnitud del problema es tal que la mortalidad total por CP es la misma que si sumamos las relacionadas con el cáncer de colon, próstata y mama, suponiendo el 20,55% de los fallecimientos relacionados con cáncer en España.

### **Factores de riesgo del cáncer de pulmón**

La relación entre el CP y el tabaco se estableció con los estudios realizados en los años 50, aunque ya en 1912 Adler fue el primero en plantear este posible vínculo (4).

En 1950, Wynder y Graham recogieron los datos de 604 pacientes con CP y los clasificaron en fumadores moderados y graves. Asimismo, tomaron como grupo control a pacientes sin diagnóstico de CP. Con los datos que obtuvieron pudieron determinar que aunque el CP se puede desarrollar en no fumadores (por lo que el tabaco no es el único factor de riesgo), la mayoría de los enfermos eran fumadores (5).

Según los últimos datos del GECP, el 39,5% de los afectados son fumadores habituales mientras que otro 44,6% son exfumadores (3).

Las diferencias en incidencia entre sexos observadas hace años, actualmente van disminuyendo, debido, en general, a los cambios en el hábito tabáquico en ambos grupos (6). El 80% de los casos de CP en varones se relacionan con el tabaco, porcentaje que disminuye al 50% en mujeres, sin olvidar que un porcentaje de estos casos son sufridos en

fumadores pasivos.

El asbesto es también un importante factor de CP. La exposición crónica aumenta el riesgo de desarrollar CP en cinco veces respecto al resto de la población. Si a una exposición crónica le añadimos un hábito tabáquico severo, este riesgo se ve aumentado en 50 veces en comparación con una población sin contacto (6).

Otro factor relacionado con la aparición de CP es la contaminación medioambiental. Múltiples estudios han valorado la influencia de la contaminación en el CP, por ejemplo el estudio ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects) (7). Este estudio prospectivo demostró una asociación entre el CP y la presencia de partículas ambientales con diámetro menos de 10  $\mu\text{m}$ . Asimismo, se observó un aumento del riesgo de padecer CP en la población de zonas urbanas, aunque el nivel de partículas se encontrara por debajo de los límites legales. Con estos resultados y los obtenidos en otros artículos similares, la International Agency for Research on Cancer (IARC), clasificó la polución como factor carcinógeno en humanos. La exposición a radón también ha sido relacionada con mayor riesgo de sufrir CP, con un 9% de muertes relacionadas con CP y un 2% de todas las muertes por cáncer en Europa. Esta asociación fue demostrada por estudios en mineros que trabajaban en minas de uranio sin ventilación (8). Al igual que el asbesto, su asociación con el tabaco produce un importante aumento en el riesgo de sufrir CP (9).

Además de los factores relacionados ya mencionados, la IARC publicó un listado con otros asociados como arsénico, cromo, níquel, componentes policíclicos aromáticos y clorometiléter, entre otros.

Además de estos factores externos, ciertas enfermedades pulmonares aumentan el riesgo de padecer CP.

La EPOC es la patología más frecuente de este grupo de enfermedades, afrontando los pacientes con enfisema un riesgo aumentado de CP por encima del atribuible exclusivamente al del consumo de tabaco (10).

El antecedente de tuberculosis (TBC) y/o silicosis predispone al desarrollo del llamado “scar cancer”, desarrollado como su nombre indica sobre una cicatriz previa (10).

La predisposición de los pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un tema discutido. Hay estudios que demuestran una mayor incidencia de CP en este tipo de pacientes, si bien generalmente presentan sesgos que dificultan la interpretación. En 1998, se publicó un artículo en el que se observó un riesgo aumentado, 6,5 veces respecto a población sana (11). Asimismo en 2001, se realizó un estudio en Nueva York, sobre pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) cuyos resultados confirmaron también este incremento (12).

### **La evolución del proceso diagnóstico del cáncer de pulmón**

La aparición de síntomas y signos de índole respiratoria, principalmente en sujetos de alto riesgo, obliga a descartar el diagnóstico de CP.

El proceso diagnóstico debe realizarse de forma reglada y minuciosa para ofrecerle al paciente la mejor información y tratamiento, según su histología y estadio.

En este camino es recomendable seguir una serie de pasos, que nos aseguren la mejor praxis posible (13):

- A pesar de tener un estadio clínico determinado por la exploración física y las pruebas radiológicas, es mandatorio obtener muestra histológica. Este principio toma especial importancia en caso de sospecha de afectación de ganglios linfáticos donde el aumento de tamaño o del valor de captación máximo en la tomografía por emisión de positrones (PET) puede ser debido a otras causas.
- Esta confirmación histológica debe realizarse idealmente con el mínimo número de pruebas y, a ser posible, dejando las más invasivas como último recurso en caso de fracaso de las menos invasivas. La estadificación debe determinarse con precisión utilizando la cantidad mínima de pruebas y procedimientos. Una de las opciones para cumplir esta recomendación es realizar primero aquellas exploraciones que nos ofrezcan el diagnóstico de estadios más avanzados. Por ejemplo, realizar el diagnóstico de metástasis a distancia que no la afectación locorregional.
- Si a pesar de haber realizado todas las pruebas disponibles, no se llega a una estadificación clara, se recomienda asignar al paciente el estadio más bajo posible. Esta acepción puede provocar que pacientes con estadios avanzados sean sometidos a intervención quirúrgica, pero disminuirá las posibilidades de que a un paciente con estadio inicial se le catalogue como no quirúrgico.

Las principales pruebas diagnósticas que se realizan en estos casos son:

- Radiografía de tórax (RxTx): suele ser la prueba inicial en aquellos pacientes sintomáticos o presentarnos la enfermedad como hallazgo casual. Sin embargo, la RxTx es normal en el 4% de los pacientes con



CP.

- Análisis de sangre: incluye hemograma, bioquímica con perfil nutricional, hepático y renal. Además de ofrecer una valoración del estado del paciente, puede ayudar en la sospecha de presencia de metástasis.
- Tomografía axial computarizada (TAC) toracoabdominal: presente en todos los algoritmos diagnósticos del CP, facilitando un estadiaje clínico. Se basa en criterios morfológicos y nos proporciona una información anatómica excepcional. De esta forma, nos ofrece una mejor visión general de las lesiones pulmonares (tamaño, forma, localización...), la presencia de adenopatías y/o de derrame pleural no objetivado en la RxTx. Así mismo, se realiza estudio abdominal para descartar lesiones a distancia, principalmente hepáticas y de glándulas suprarrenales.
- Tomografía por emisión de positrones (PET): al igual que el TAC, el PET es prueba indispensable en el proceso diagnóstico. Ofrece información sobre la actividad metabólica de las lesiones y al igual que el TAC, determina el estadio clínico del tumor. El aumento de esta actividad se ve reflejado por el atrapamiento de la 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-desoxi-D-glucosa (<sup>18</sup>F-FDG). Este fármaco es transportado al interior de las células y ante la imposibilidad de uso en la vía glucolítica es detectable en el PET. Las lesiones hipercaptantes aumentan la sospecha de malignidad, pero este aumento del valor máximo de captación, standardized uptake value (SUVmax), no es exclusivo del CP. El aumento del SUVmax se distribuye de forma fisiológica en

órganos sanos y puede también acumularse dentro de las células en procesos inflamatorios, infecciosos, tumores benignos, etc, recomendándose confirmación histológica de las lesiones sospechosas.

- Fibrobroncoscopia flexible (FBC): nos posibilita la exploración del árbol bronquial, desde proximal hasta bronquios subsegmentarios, siendo una herramienta diagnóstica y de estadiaje muy útil. Ofrece una visión directa de lesiones endobronquiales y su biopsia. En caso de observar una compresión extrínseca nos ofrece la oportunidad de realizar biopsias transbronquiales.
- Ecobroncoscopia (EBUS): la incorporación de la ecografía a la broncoscopia ha permitido la exploración de ganglios mediastínicos como un arma más en el proceso diagnóstico y de estadificación. Mediante EBUS se puede alcanzar las regiones ganglionares 2L, 4L, 10L, 11L, 2R, 4R, 10R, 11R y 7. (14) (15).
- Ecoesofagoscopia (EUS): facilita la punción de los ganglios localizados en las regiones 2L, 4L, 8R, 8L, 9R, 9L y 7. (14) (15).

La combinación de estas dos últimas técnicas mejora la sensibilidad y especificidad en el proceso de estadificación mediastínica.

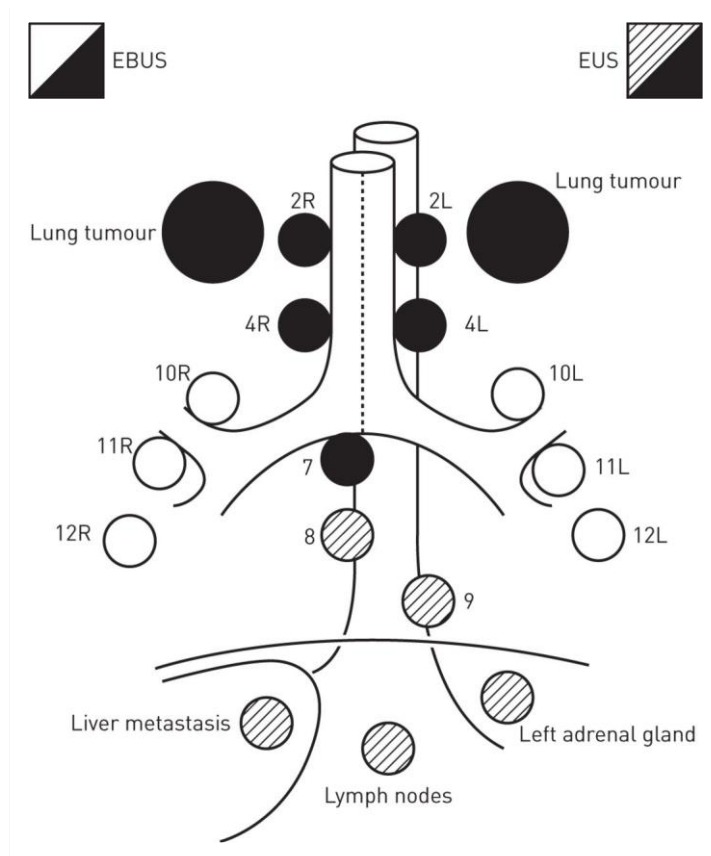


Figura 1. Estaciones ganglionares accesibles EBUS y EUS (15).

- Punción transtorácica del tumor: útil en aquellos casos en los que no se ha obtenido diagnóstico anatomopatológico mediante otras pruebas.
- Exploración quirúrgica del mediastino (mediastinoscopia, mediastinotomía, mediastinoscopia cervical extendida, toracoscopia): estas técnicas aportan tanto diagnóstico histológico como apoyo en la estadificación.
- Punción de lesiones sospechosas a distancia: se recomienda en los casos donde hay una alta sospecha de metástasis, como prueba tanto diagnóstica como en el proceso de estadificación.
- Otras pruebas de imagen: resonancia magnética, gammagrafía ósea...

- Otras técnicas invasivas: si no se ha obtenido suficiente material para un diagnóstico histológico exacto o hay afectación a distancia, hay otras técnicas disponibles como la pericardioscopia, biopsia de adenopatías, toracoscopia o incluso la toracotomía.

### **Clasificación histológica cáncer broncogénico de célula no pequeña**

Como se ha comentado previamente, la necesidad de obtener un diagnóstico lo más exacto posible se debe a la importancia tanto en términos de posibles tratamientos a ofrecer al paciente como en el ámbito de información sobre pronóstico.

La World Health Organization (WHO) estudió la importancia como factor pronóstico de los diferentes grupos histológicos del CPNCP, publicando en 2015 la última revisión sobre la clasificación histológica, que se refleja en la tabla 1 (16).

## TUMORES EPITELIALES

### **Adenocarcinoma**

- Lepídico
- Acinar
- Papilar
- Micropapilar
- Sólido
- Mucinoso invasivo
  - Mucinoso invasivo mixto y no mucinoso
- Coloide
- Fetal
- Entérico
- Mínimamente invasivo
  - No mucinoso
  - Mucinoso
- Lesiones preinvasivas
  - Hiperplasia adenomatoide atípica
  - Adenocarcinoma in situ
    - No mucinoso
    - Mucinoso

### **Escamoso**

- Queratinizante
- No queratinizante
- Basaloide
- Lesiones preinvasivas
  - Escamoso in situ

### **Neuroendocrino**

- Carcinoma célula pequeña
  - Carcinoma célula pequeña combinado
- Carcinoma neuroendocrino célula grande
  - Carcinoma neuroendocrino célula grande combinado

### **Carcinoide**

- Típico
- Atípico

### **Lesiones preinvasivas**

Hiperplasia neuroendocrina pulmonar difusa idiopática

### **Carcinoma célula grande**

#### **Adenoescamoso**

#### **Sarcomatoide**

- Pleomórfico
- Células espinosas
- Células gigantes
- Carcinosarcoma
- Blastoma pulmonar

### **Carcinoma no clasificados y otros**

- Linfoepitelioma-like
- NUT???

### **Carcinoma de tipo glándula salivar**

- Mucoepidermoide
- Adenoide cístico
- Epitelial-mioepitelial
- Adenoma pleomórfico

Tabla 1. Clasificación histológica (16).

Además de determinar el tipo histológico del tumor, debe hacerse referencia al grado de diferenciación celular (17). Esta clasificación determina diferentes categorías según las características de las células tumorales observadas.

GX: no determinado.

G1: bien diferenciado.

G2: moderadamente diferenciado.

G3: pobremente diferenciado.

G4: indiferenciado.

En el caso de los carcinomas escamosos, esta agrupación se determina de la siguiente manera: (18)

- Bien diferenciado: muestra áreas de queratinización y puentes intercelulares fácilmente reconocibles, con crecimiento en sábana y destrucción del parenquima pulmonar normal. Las células tumorales tienen forma oval, con moderada cantidad de citoplasma eosinofílico y núcleo pequeño. Se objetivan figuras mitóticas, las cuales pueden ser numerosas. Las áreas de necrosis y/o hemorragia están ausentes o su presencia es únicamente focal.
- Moderadamente diferenciado: se observan áreas en las que se puede identificar la queratinización o los puentes intercelulares. Las áreas de hemorragia y/o necrosis son más extensas. El pleomorfismo celular y las figuras mitóticas también son más prominentes.
- Pobremente diferenciado: exhibe crecimiento en sábana con ausencia de diferenciación celular. La presencia de necrosis y hemorragia es extensa. La actividad mitótica y el pleomorfismo celular también es marcada.

De la misma manera en el grupo de los adenocarcinomas, caracterizados por la presencia de diferenciación glandular, la clasificación se define:

- Bien diferenciado: se observan colecciones intraluminales de material mucinoso. La proliferación glandular atípica ocupa el lugar del parénquima normal. Las glándulas malignas se componen de epitelio mucinoso o columnar con células ovales. Citoplasma amplio, núcleo redondo y nucléolo prominente. La mitosis puede estar ausente o presentarse también con zonas de hemorragia y necrosis. La proliferación glandular puede estar enclavada en áreas de tejido fibrocolagenoso.
- Moderadamente diferenciado: la proliferación glandular es evidente. El componente celular puede exhibir una atípia celular más prominente. Las regiones de necrosis, hemorragia y reacción inflamatoria son más amplias.
- Pobrementemente diferenciado: entramado de células malignas con diferenciación glandular focal. Gran citoplasma, con núcleo de forma redonda/oval y prominente nucléolo. Las células pueden mostrar vacuolización del citoplasma y mucina intracelular. A pesar de la pobre diferenciación, hay zonas de diferenciación glandular normal que facilitará la clasificación del tumor en el grupo de adenocarcinoma.

### **Clasificación TNM**

La principal clasificación del CPNCP se basa en la extensión del tumor primario (T), el grado de afectación tumoral de los ganglios linfáticos (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M).

La 7<sup>o</sup> edición de la clasificación TNM basada en las recomendaciones de la IASLC se detalla en la tabla 2 (19).

Tabla 2. CLASIFICACIÓN CPNCP TNM IASLC. 7 <sup>o</sup> EDICIÓN	
<b>Tx</b>	Tumor primario que no puede ser evaluado, o se demuestra en citología de esputo o lavado bronquial con imágenes y endoscopia negativas.
<b>T0</b>	Sin evidencia de tumor primario.
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ.
<b>T1</b>	Tumor $\leq$ 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por tejido pulmonar o pleural visceral, sin evidencia de invasión proximal al bronquio principal en la fibrobroncoscopia.
<b>T1a</b>	Tumor $\leq$ 2 cm en su diámetro mayor.
<b>T1b</b>	Tumor $>$ 2 cm, pero $\leq$ 3 cm en su diámetro mayor.
<b>T2</b>	Tumor $>$ 3 cm, pero $\leq$ 7 cm en su diámetro mayor, o tumor con cualquiera de las siguientes características: afecta al bronquio principal, se encuentra a 2 cm o más de la carina; invade la pleura visceral; está asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hiliar, pero no afecta al pulmón entero.
<b>T2a</b>	Tumor $>$ 3 cm, pero $\leq$ 5 cm en su diámetro mayor.
<b>T2b</b>	Tumor $>$ 5 cm, pero $\leq$ 7 cm en su diámetro mayor.
<b>T3</b>	Tumor $>$ 7 cm o de cualquier tamaño que invade directamente una de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo los tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor que se encuentre a menos de 2 cm de la carina, pero sin invadirla; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero; o existencia nódulo(s) en el mismo lóbulo.
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; o existencia de nódulo(s) en un lóbulo diferente del pulmón homolateral.
<b>Nx</b>	Ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
<b>N0</b>	Sin ganglios linfáticos regionales comprometidos.
<b>N1</b>	Metástasis ganglionares peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales, incluyendo la afectación por extensión directa de los ganglios intrapulmonares.
<b>N2</b>	Metástasis ganglionares mediastínicas homolaterales y/o subcarinales.
<b>N3</b>	Metástasis ganglionares mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas ipsilaterales y contralaterales o supraclaviculares.
<b>Mx</b>	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia.
<b>M1</b>	Existencia de metástasis a distancia.
<b>M1a</b>	Existencia de nódulo(s) en un lóbulo del pulmón contralateral; tumor con nódulos pleurales; o derrame pleural o pericárdico maligno.
<b>M1b</b>	Existencia de metástasis a distancia (extratorácicas).



Según la afectación de los diferentes componentes determinados según el TNM, el tumor se clasificará en distintos estadios reflejados en la tabla 3.

Estadios			
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1 a-b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T1 a-b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Estadio IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1,T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
	T4	N0,N1	M0
Estadio IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1a-b

Tabla 3. Clasificación por estadios (19).

Así mismo, estos estadios se pueden agrupar en:

- Precoces: en el que se incluyen los estadios I y II.
- Localmente avanzados: considerados los estadios IIIA y IIIB.
- Avanzados: que abarca el estadio IV.

### Tratamiento según estadio

La supervivencia global del CPNCP a 5 años se encuentra entre el 5 y el 15%. La mortalidad relacionada con el CPNCP es un problema importante ya que aunque el paciente se diagnostique en estadio I y sea candidato a cirugía, solo el 70-80% seguirán vivos a los 5 años.

Únicamente un 20-30% de los pacientes serán candidatos a cirugía

potencialmente curativa. Otro 35% será diagnosticado en un estadio localmente avanzado, con una estrategia terapéutica basada en tratamiento oncológico. El 40% restante presentará una enfermedad avanzada cuyo tratamiento será con intención paliativa.

## ESTADIO I

Las recomendaciones recogidas en las guías en relación a este grupo son claras. El mejor tratamiento a llevar a cabo es la resección quirúrgica, siempre que no haya contraindicaciones.

La intervención a realizar se verá determinada por la localización y tamaño tumoral. De forma tradicional, la recomendación se basaba en la resección lobar correspondiente. En las últimas décadas, han aparecido trabajos donde se estudia la posibilidad de realizar resecciones sublobares en casos determinados con similares resultados a las resecciones lobares (20) (21).

Tras la resección, la supervivencia a 5 años varía entre el 50% y el 73% en el estadio IA según diferentes series. Esta tasa decae en el estadio IB hasta el intervalo del 43% al 58%.

A pesar de estas tasas de supervivencia y aunque hay poca información sobre el beneficio de la quimioterapia (QT) adyuvante se ha determinado que el tratamiento adyuvante en el estadio IA no ofrece beneficio. En el metaanálisis Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation (LACE) se objetivó que los pacientes que recibieron adyuvancia presentaron tendencia a una peor supervivencia tras recibir QT que aquellos del brazo únicamente quirúrgico. (22).

En el caso de los IB, la opción de adyuvancia no está clara. En el caso del

LACE, se demostró una reducción no significativa de la mortalidad de un 8% unido a una mejora de la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes que recibieron esquema de QT. Aunque el beneficio es superior según el estadio es más avanzado, en este estadio la hazard ratio (HR) determinada fue 0.93 (22).

Sin embargo, en el estudio JBR10 el beneficio de tratar con adyuvancia a los pacientes del grupo IB no se demostró. Si se comprobó un aumento del riesgo de muerte en los pacientes del brazo quirúrgico. Mención a parte se debe hacer a los tumores con un tamaño superior a 4 cm. En estos sí se comprobó una mejora de la supervivencia a los 5 años, que alcanzó el 79%, por encima del 59% en el grupo de observación, por lo que el tratamiento estándar en este grupo es la resección pulmonar seguido de QT adyuvante (23).

El problema es que estos estudios se realizaron según la 6ª edición de la clasificación TNM, en la cual los tumores mayores de 5 cm pasaron a clasificarse como estadio IIA donde la necesidad de adyuvancia si es recomendada.

## ESTADIO II

En este estadio, el grupo de pacientes es más heterogéneo. Encontramos desde pacientes con afectación ganglionar N1 hasta pacientes con tumores de tamaño mayor a 7 cm (T3). Es por esto, que aun estando en el mismo grupo los pacientes podrán ser tratados de forma distinta, siendo su base la resección pulmonar seguida de tratamiento adyuvante.

Al igual que en el estadio I, las tasas de supervivencia varían según las series

y comprenden desde 36 al 46% en el estadio IIA, disminuyendo en el IIB desde el 25 al 36% a los 5 años.

El tratamiento inicial continúa siendo la resección quirúrgica completa. Según el estadio patológico que se defina tras la cirugía, el proceso terapéutico deberá ser completado con adyuvancia, tanto QT como RT.

Los pacientes en los que se compruebe con el estudio anatomopatológico la presencia de infiltración ganglionar N1, habiendo descartado el N2, las recomendación es llevar a cabo la resección pulmonar correspondiente, ya que por ejemplo en el estudio NATCH se observó un efecto negativo de la neoadyuvancia sobre estos pacientes sin ofrecer una mejora en la supervivencia global ni libre de enfermedad (24). Si posteriormente se halla afectación N2 se realizará el tratamiento adyuvante recomendado.

En el subgrupo de pacientes T3 que se hayan incluido por la infiltración de estructuras vecinas (pleura parietal, pared torácica, diafragma, pleura mediastínica o pericardio) será necesario la resección de éstas para conseguir la resección completa (R0). Si la R0 no se logra, múltiples estudios han determinado el beneficio en supervivencia global del uso de RT adyuvante (25) (26).

### ESTADIO IIIA

Este grupo se compone de un amplio y heterogéneo abanico de subgrupos, cuya supervivencia media ronda entre el 19% al 24%.

#### *T4*

La pertenencia a este grupo, con infiltración de estructuras vecinas, se consideró de inicio una razón para rechazar la cirugía. Con los avances

quirúrgicos de los últimos tiempos y el manejo multidisciplinar, hay casos en los que la resección es una opción. Para poder ofrecer esta alternativa, se debe determinar que el tumor es resecable completamente. El tratamiento neoadyuvante ayudará a conseguir esta R0, que junto con la afectación mediastínica representan una parte importante del pronóstico del paciente. Dartevelle et al publicaron su experiencia de 30 años en tumores T4 con una supervivencia a 5 años del 44%, en pacientes N0-N1 y con resección completa del tumor (27).

## N2

A pesar de los múltiples estudios realizados, la discusión sobre la mejor acción a tomar en los N2 sigue abierta.

Si el paciente presenta N2 bulky, multiestación o se determina N2 con imposibilidad de R0, el camino terapéutico que se recomienda seguir es QT/RT radical.

Por otro lado, tenemos los pacientes N2 inesperados. Estos son aquellos que a pesar de haber realizado un buen proceso diagnóstico, el N2 se diagnostica de forma postoperatoria. En estos casos, la cirugía debe ser seguida de QT adyuvante (28). La RT adyuvante ofrece una disminución de las recidivas locales pero su efecto sobre la supervivencia no ha sido claramente demostrada. (29)

Finalmente nos encontramos con los pacientes N2 comprobados mediante anatomía patológica preoperatoriamente. Las estrategias en este grupo son amplias y aún discutidas: QT neoadyuvante seguida de cirugía, QT/RT neoadyuvante seguida de cirugía o QT/RT concurrente definitiva (30)(31). Aunque no se puede dar una recomendación tajante, el tratamiento trimodal

es el que mejor supervivencia libre de enfermedad ha demostrado, siempre y cuando la cirugía a realizar no sea una neumonectomía según el estudio Lung Intergroup Trial 0139 (32). En el que caso de iniciar el tratamiento con QT neoadyuvante, la RT postoperatoria no se contempla de forma habitual. Se está llevando a cabo el estudio LungArt para determinar el papel de la RT en situaciones de adyuvancia.

### ESTADIO IIIB

La supervivencia media a 5 años en estos pacientes se encuentran entre el 7% y 9%.

La estrategia terapéutica recomendada habitualmente es la combinación de QT y RT a altas dosis, descartando la resección quirúrgica. Si la situación del paciente lo permite, los mejores resultados han sido obtenidos con tratamiento concomitante (33). El esquema terapéutico habitual se compone de cisplatino-etopósido junto con una dosis total de radiación de 60 a 66 Gray (Gy).

Actualmente la National Comprehensive Cancer Network (NCCN), recomienda valorar en los pacientes que presentan T3 por nódulos en el mismo lóbulo y N2 potencialmente resecables, la opción quirúrgica tras inducción con QT +/- RT (34).

### ESTADIO IV

Con una supervivencia media que ronda del 2% al 13% a 5 años, la cirugía inicialmente no se contempla. El principal objetivo en este conjunto de pacientes es prolongar la supervivencia con la mejor calidad de vida posible.

El tratamiento en este grupo se basa exclusivamente en QT (35):

- en pacientes sin diana terapéutica se recomienda el esquema doblete de cisplatino con premetrexed (sólo si histología no escamosa) o gemcitabina, vinorelbina o docetaxel.
- los pacientes en los que se determina mutación de EGFR se recomienda tratamiento con ITK (gefitinib, erlotinib o afatinib).
- en los pacientes con traslocación de ALK se recomienda tratamiento con crizotinib en 1º línea.

A pesar de la primera frase de este apartado, hay que hacer mención especial a los casos de pacientes oligometastásicos. En estos casos en los que las metástasis son potencialmente resecables, principalmente cerebrales y suprarrenales, la cirugía se puede plantear. En 1995, Hellmann determinó que el grupo de pacientes con metastasis entre 1-5 presentaba una evolución del cáncer menos agresiva que aquellos que se diagnosticaban con un mayor número de lesiones, y los definió como oligometastásicos (36).

Previamente a esta propuesta, es obligada la exploración del mediastino para asegurar la no afectación de los ganglios. El grupo de Congedo et al realizaron un estudio retrospectivo de la experiencia en su centro y observaron unas supervivencias globales al año del 56,6% con una supervivencia media de 19 meses (37). En el caso de Bonnette et al se centraron en pacientes con metastasis cerebrales, la supervivencia fue similar con un 56% y una supervivencia media de 12,4 meses (38). La experiencia de Salah con metastasis extracerebrales y extraadrenales muestra una supervivencia a 5 años del 50%, siendo el principal factor pronóstico la afectación mediastínica (39).

Numerosos trabajos de investigación se han centrado en el estudio de diferentes factores pronósticos y métodos diagnósticos en el CPNCP. Al comienzo de estas investigaciones, los principales artículos se centraban en los aspectos clínicos y patológicos del tumor, pero en las últimas décadas se ha impulsado el estudio de nuevos métodos de diagnóstico, detección precoz de recidivas y respuesta a tratamiento. Esta corriente es principalmente debida a que más del 90% de los pacientes diagnosticados de cáncer fallecen debido a las metástasis.

### **Carcinoma de pulmón célula pequeña**

Mención a parte merece el carcinoma de pulmón de célula pequeña (CPCP). Corresponde alrededor del 10 al 20% de los pacientes diagnosticados de CP, con una relación muy importante con el tabaco (40).

Tanto la clínica como el proceso diagnóstico de este tipo de tumores es similar al CPNCP, diferenciándose principalmente en la histología y el tratamiento.

En relación a la histología, podemos observar células pequeñas con núcleos de tinción oscura, escaso citoplasma y alto índice mitótico. Además, tanto la tinción de cromogranina y de sinaptofisina suelen ser positivas por el origen neuroendocrino de estos tumores.

La estadificación del CPCP según la clasificación TNM de la IASLC se detalla en la tabla 4.



Tabla 4. CLASIFICACIÓN CPCP TNM IASLC. 7º EDICIÓN	
<b>T1</b>	Tumor $\leq$ 3 cm.
<b>T1a</b>	Tumor $\leq$ 2 cm.
<b>T1b</b>	Tumor $>$ 2 cm, pero $\leq$ 3 cm.
<b>T2</b>	Afectación bronquio principal, $\geq$ 2 cm o más de la carina; invade la pleura visceral; asociado a atelectasia parcial
<b>T2a</b>	Tumor $>$ 3 cm pero $\leq$ 5 cm.
<b>T2b</b>	Tumor $>$ 5 cm, pero $\leq$ 7 cm.
<b>T3</b>	Tumor $>$ 7 cm o de cualquier tamaño que invade: pared torácica, diafragma, pleura mediastínica, pericardio; o tumor a menos de 2 cm de la carina, pero sin invadirla; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero; o existencia nódulo(s) en el mismo lóbulo.
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, vértebra; o existencia de nódulo(s) en un lóbulo diferente del pulmón homolateral.
<b>N0</b>	Sin afectación ganglionar.
<b>N1</b>	Afectación ganglionar ipsilateral peribronquial e hilar.
<b>N2</b>	Afectación ganglionar subcarinal o ipsilateral mediastínica.
<b>N3</b>	Afectación ganglionar mediastínica o hilar contralateral, escalénicas o supraclaviculares.
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis a distancia.
<b>M1</b>	Existencia de metástasis a distancia.
<b>M1a</b>	Existencia de nódulo(s) en un lóbulo del pulmón contralateral; nódulos pleurales; o derrame pleural o pericárdico maligno.
<b>M1b</b>	Existencia de metástasis a distancia (extratorácicas).

Otro sistema de estadificación es el descrito por el "Veterans Administration Lung Cancer Study Group", que divide a los pacientes únicamente en dos estadios:

- pacientes con enfermedad localizada con afectación de un único hemitórax y cuya afectación ganglionar regional o supraclavicular puede abarcarse en el campo de radiación o
- extendida con presencia de lesiones a distancia (41).

La base terapéutica principal en este grupo de pacientes es la quimioterapia junto con radioterapia a diferencia del CPNCP donde la cirugía tiene un papel con mayor protagonismo (42).

Alrededor de un 5% de los pacientes se encuentran en estadios iniciales, presentando T1-2 y N0-N1. Es en estos casos en los que la opción quirúrgica es valorable, siempre habiendo descartado la afectación N2 y la presencia de metástasis. Además de la intervención, estos pacientes deben ser sometidos a tratamiento quimioterápico adyuvante, acompañado de RT si se observara afectación de ganglios mediastínicos en los resultados de anatomía patológica.

En pacientes con enfermedad localizada pero no candidatos a cirugía la recomendación terapéutica se basa en la QT/RT concomitante (42).

Independientemente del tratamiento recibido por el paciente, se recomienda la radioterapia holocraneal profiláctica, puesto que se ha relacionado con una mayor supervivencia a largo plazo (41).

En los pacientes diagnosticados de enfermedad metastásica, el esquema terapéutico se basa en QT, a la que puede añadirse la RT holocraneal profiláctica. Tras el tratamiento quimioterápico y en aquellos pacientes con respuesta completa o parcial se recomienda RT de consolidación.

### **Células tumorales circulantes**

Las células tumorales circulantes (CTC) son células malignas liberadas desde el tumor primario y desde las metástasis al torrente sanguíneo, con supuesta capacidad metastatizante. Una definición extendida de estas células recoge que son células EpCAM positivas, CK 8, 18 o 19 positivas, con núcleo intracelular, sin expresión de CD45 y con al menos un tamaño de 4  $\mu\text{m}$  (43).

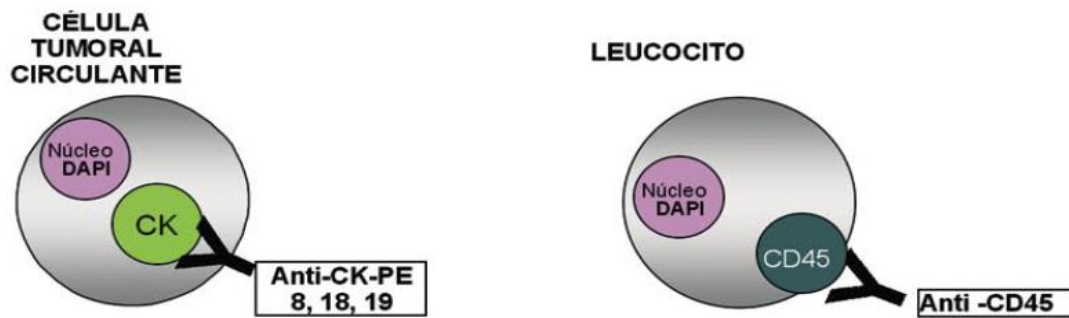


Figura 2. Características células tumorales circulantes.

Estas células son consideradas excepcionales en comparación al número de células sanguíneas. Incluso en pacientes metastásicos con abundantes CTCs, la presencia de leucocitos es del orden de  $10^4$  a  $10^7$  por cada CTC .

A estas células malignas se les supone la capacidad de navegar por el torrente sanguíneo y tras cruzar la barrera epitelio-mesenquimal anidar produciendo nuevas metástasis.

Pero no todas las células alcanzan con éxito este objetivo. Estas células pueden permanecer en el órgano diana durante años y en menos de la mitad de los pacientes se desarrollarán metástasis (44).

La primera descripción de estas CTC, la realizó el Dr Thomas Ashworth en 1869 tras hallar células tumorales con “apariencia similar al tumor primario” en la circulación de un paciente con cáncer metastásico (45). En 1889, Paget describió el proceso “the seed and the soil”, en el que se determina la necesidad de un intercambio de información entre las células tumorales para llevar a cabo la metástasis (the seed) debiendo existir un ambiente específico en un determinado órgano (the soil) (46).

A principios del siglo XX, Quensel estudió, en el momento del fallecimiento, muestras sanguíneas de 50 pacientes con diagnóstico de cáncer, hallando en 6 de ellos células tumorales (47).

Fue en 1955 cuando la detección de estas células tomó más importancia tras la investigación de Engell, que usó una técnica de bloques celulares en distintas clases histológicas (48). Asimismo, entre 1955 y 1965, se estudiaron muestras de cientos de pacientes con diagnóstico tumoral por diferentes equipos investigadores y diversos métodos citológicos (49). Los resultados iniciales presentaron resultados alentadores con una alta tasa de detección. En poco tiempo se descubrió que estos resultados presentaban un gran número de falsos positivos debido a su confusión con células sanguíneas, principalmente megacariocitos (50). Tras estos hallazgos, el estudio de las células tumorales fue olvidado hasta la aparición de técnicas inmunohistoquímicas.

Desde entonces, múltiples dispositivos han sido diseñados para detectar y aislar CTC. Estos pueden dividirse en diferentes grupos dependiendo de la tecnología de detección usada:

- 1- Métodos indirectos: se realiza la detección de los genes tumorales específicos presentes en sangre periférica mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Un ejemplo, es el uso de la CK-19 para la detección de células epiteliales presentes en la muestra sanguínea (51).
- 2- Métodos directos: el beneficio de estos métodos es que las células se aíslan conservando todas sus características y facilitando así su análisis posterior. En este grupo encuadramos los métodos de selección de tamaño, de citometría de flujo, selección inmunomagnética tanto positiva como negativa, etc (51).

En el grupo de los métodos directos se halla el sistema CellSearch®

(Veridex), pionero en el desarrollo de un sistema estandarizado para la detección de CTC. Las muestras de sangre se procesan en un sistema semiautomático llamado CellsTracks®AytoPrep System. Esta tecnología se basa en un ferrofluido coloidal que contiene nanopartículas magnéticas recubiertas con anticuerpos frente a la molécula de adhesión de la célula epitelial (anti-EpCAM) contra antígenos epiteliales, el cual se mezcla con la sangre extraída al paciente para realizar la separación inmunomagnética. La muestra enriquecida en células epiteliales se fija y tiñe con anticuerpos marcados con fluorescencia contra un panel de citoqueratinas 8, 18 y 19 (CK), el antígeno leucocitario CD45 (los anticuerpos anti-CD45 marcados con alofococianina) y se tiñen con la tinción fluorescente para ácidos nucleicos 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Los leucocitos son identificados al ser células nucleadas y teñidas con DAPI, diferenciándolas al ser marcadas con anti-CD45. Las CTC se identifican como células redondas u ovals, mayores a 4 µm, con un citoplasma teñido positivamente para CK y negativamente para CD45, junto con un núcleo intacto y positivo para DAPI en más del 50%. Los resultados se analizan en el analizador celular CellSpotter Analyzer®. Las imágenes obtenidas deben ser interpretadas por personal instruido en el campo de identificación celular. El sistema CellSearch® es el único que ha obtenido la aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos de EEUU (FDA) como sistema de detección de CTCs en cáncer de mama, colon y próstata (52).

Otro de los sistemas más utilizados es "Isolation by size of epithelial tumor cells" (ISET® por ScreenCell): La base de esta tecnología es la separación de células por tamaño. Las células tumorales son habitualmente más grandes

que las células sanguíneas normales. La medida habitual de los linfocitos oscila entre 1,5 y 4  $\mu\text{m}$  y la media de los monocitos es 7,2  $\mu\text{m}$ . Esta técnica evita el uso de los marcadores epiteliales para la detección de las CTCs. La sangre se coloca en membranas de policarbonato que presentan poros de 8  $\mu\text{m}$  de tamaño, por donde fluyen las células quedando atrapadas las de mayor tamaño, las CTCs.

El sistema CTC-chip se basa en una matriz de 78000 microporos que presentan una superficie recubierta de anticuerpos anti-EpCAM, capturando así las CTCs que los atraviesan en situación de un flujo laminar controlado. Se identifican las CTCs usando el marcador DAPI, los anticuerpos anti-CK y el CD45. A continuación se realiza un análisis de las imágenes fluorescentes tomadas.

En el grupo de las tecnologías basadas en citometría de flujo, se encuentra FAST® (tecnología de escaneo de fibra óptica). Este equipo detecta CTCs mediante inmunofluorescencia sobre sustratos de vidrio sin necesitar un procedimiento de enriquecimiento (53).

En el caso de EPISPOT®, la identificación de las CTCs se realiza al localizar células que secretan proteínas específicas de estas células (CK, MUC, PSA, etc.). Este sistema defiende que sólo se aíslan CTCs viables, ya que éstas son las únicas que pueden secretar proteínas de forma adecuada para ser detectadas (54).

El sistema OncoQuick™ se basa en la diferenciación por densidad. La muestra sanguínea se somete a un proceso de centrifugación tras ser colocada sobre un filtro poroso con un medio de separación. Por esta diferencia de densidades, las células sanguíneas se localizan en el fondo y

las CTCs, quedan ancladas en el filtro al no ser posible atravesar los poros.

El NanoVelcro® basa su tecnología en la inmunoafinidad. Diseñado con nanocables de silicio en su sustrato inferior, expone una superficie con mayor número de anticuerpos anti-EpCAM y un micropatrón en la zona superior para realizar una mezcla correcta (55).

Este gran abanico de métodos de detección y aislamiento de CTC provoca que haya una gran inconsistencia metodológica entre los diferentes trabajos publicados. Esta variabilidad trae consigo una dificultad añadida para la unificación de resultados y el logro de unas conclusiones sólidas.

El dispositivo ideal para detectar y aislar CTCs debería cumplir los siguientes requisitos (56):

- 1- Alta sensibilidad.
- 2- Alta especificidad.
- 3- Capacidad de detección sin contaminación.
- 4- Preservación de la viabilidad, de la morfología y de las proteínas ADN de las CTCs.
- 5- Bajo coste, alto rendimiento y tiempo mínimo requerido.
- 6- Reproducibilidad.

La detección de CTCs mediante el sistema CellSearch® se ha determinado como factor pronóstico en el cáncer de mama metastásico, de colon y de próstata.

En el caso del cáncer de mama metastásico, el grupo de Cristofanilli realizó un estudio multicéntrico prospectivo donde se determinó que las pacientes que presentaban un número mayor a 5 CTCs previo al inicio del nuevo tratamiento o en la primera visita de seguimiento tenían una supervivencia

global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) inferior a aquellas con menos de 5 CTCs (57). Estos resultados han sido reproducidos por otros grupos con similar y diferente tecnología de aislamiento. Asimismo, también se ha observado que la modificación en el número de CTCs a lo largo del tratamiento es un posible indicador de respuesta al tratamiento y de SG (58). También se ha estudiado el efecto de la presencia de CTCs en cáncer de mama localizado. En el estudio Remagus 02, el hallazgo de 1 o más CTCs previo a la QT neoadyuvante se relacionaba de forma significativa con el desarrollo de enfermedad metastásica (59). El grupo de Franken también determinó que la presencia de 1 o más CTCs previo a la cirugía con intención curativa se asociaba con un aumento del riesgo de muerte por cáncer de mama (60).

En los pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal (CCR), se han realizado distintos estudios para establecer si la presencia de CTCs empeoraba el pronóstico de los enfermos. Cohen et al, marcaron como punto de corte desfavorable el aislamiento de 3 o más CTCs en CCR metastásico. Concluyeron que el número de CTCs era un factor independiente de SLP y de SG. Con el mismo punto de corte, Tol observó que los pacientes del grupo adverso presentaban una peor SLP y SG (61).

Si nos centramos en pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata hormonorresistente, diversos artículos han demostrado la importancia pronóstica de la presencia de  $\geq 5$  CTCs en sangre periférica. En el artículo de De Bono encontramos una diferencia en la SG entre ambos grupos, 21,7 meses frente a 11,5 meses, según el número de CTCs en la muestra pre-tratamiento. Pero no sólo la muestra pre-tratamiento determinaba el



pronóstico. La modificación del número de CTCs a lo largo del tratamiento y así el cambio del grupo adverso al favorable y viceversa, también modificaba el pronóstico (62).

Aunque sólo esté aprobado el método CellSearch® con estos tres tipos de tumores, se han efectuado análisis en otros tantos con distintos resultados y diferentes tecnologías.

En el cáncer de ovario, los resultados son dispares según el artículo que se lea. En el grupo de Poveda, analizaron 216 muestras previo a inicio del tratamiento con CellSearch®, objetivando que un número elevado de CTCs se asociaba a un riesgo de progresión y muerte más elevado (63). En el otro extremo, Liu et al no observaron ni en pacientes con diagnóstico reciente ni en recurrencias, ninguna correlación entre la presencia de CTC y una peor SLE o SG (64).

En el caso del páncreas, hay estudios que han observado una peor SG si se detectan CTCs (65). En 2014, Han escribió un metaanálisis en el que evaluaron el valor pronóstico de estas células en este tipo de tumor. Tras la inclusión de 268 pacientes positivos y 355 negativos, estimaron que los primeros tenían una SLP y SG inferior a la que presentaba el grupo CTC-negativo (66). Estos resultados han sido corroborados en el metaanálisis de 2017 realizado por Stephenson con 855 incluidos (67).

Los estudios realizados en CPCP, hepatocarcinoma, cáncer de vejiga y en cáncer de cabeza y cuello han hallado similares resultados que los comentados previamente, con una peor SLE, SLP y SG (68) (69)(70)(71)(72).

En relación al CPNCP, los hallazgos son más variables según los estudios. El uso de tantos dispositivos diferentes y la determinación de distintos puntos de

corte con carácter pronóstico dificultan el uso de las CTCs en la práctica clínica, principalmente en no metastásicos.

En estadios avanzados usando CellSearch®, Krebs et al estudiaron la relación de las variaciones en el conteo de CTCs con el pronóstico. Hallaron una relación inversa entre el aumento del número de CTCs y la disminución de meses de supervivencia. Se observó que aquellos pacientes en los que se aislaron en la muestra pretratamiento 5 o más CTCs presentaban peor SG. De la misma manera, aquellos en los que se mantenía el recuento de CTCs por debajo de 5 tras el 1º ciclo de QT presentaban mejor SG y SLP. Con estos resultados, establecieron que el número de CTCs era un factor independiente pronóstico de SLP (73).

El grupo de Juan et al, no encontró ninguna relación entre la presencia de CTCs y un peor pronóstico en la muestra previa al inicio del tratamiento. Tras el análisis de las muestras tras dos ciclos de QT, mostraron una relación entre la negativización de las CTC y una mejor SG y SLP (74).

En 208 pacientes con CPNCP resecable, Hofman et al estudió mediante el método ISET® las muestras de sangre periférica tomadas inmediatamente antes de la intervención quirúrgica. Tras un seguimiento medio de 24 meses, determinaron que la presencia de 50 CTCs o más marcaba una SG y SLE más cortas, independientemente del estadio del tumor (75).

Este mismo grupo llegó a un resultado similar al comparar CellSearch® con ISET®. Estudiaron 250 muestras de pacientes quirúrgicos. Aislaron CTCs en 50% de los pacientes con ISET® y 39% con CellSearch®. La SLE más prologada la presentaron los pacientes que no presentaron ninguna célula o que sólo se determinaron por uno de los dos métodos, con ISET® y 39% con

CellSearch®. La SLE más prologada la presentaron los pacientes que no presentaron ninguna célula o que sólo se determinaron por uno de los dos métodos. La presencia de CTCs se estimó como factor de mal pronóstico independiente de SLE (76).

En el grupo español de Bayarri et al se observó que la presencia de CTCs tras cirugía se relacionaba con mayor riesgo de recurrencia precoz. Analizaron 56 pacientes resecables con MACS Technology®. Aquellos enfermos que presentaron CTCs tras la resección pulmonar presentaron una tasa de recurrencia precoz más alta y una SLE más corta (77).

A pesar de estos resultados, el nivel de evidencia en el CPNCP es más bajo que en otros tumores. Algunas de las razones ya se han descrito previamente, como el escaso número de CTCs en comparación con células sanguíneas, el uso de distintas tecnologías y de diferentes metodologías según el grupo investigador y la baja sensibilidad y especificidad de los dispositivos.

Otra de las posibles razones que afectan a la detección de las CTCs son las alteraciones que sufren las células en la transición de la barrera epitelio/mesenquimal (TEM). Esta transición, fue caracterizada por primera vez en 1995 (78). Se trata de un proceso por el cual las células sufren alteraciones en sus propiedades epiteliales, perdiendo la adhesión intercelular, la polaridad apical-basal y la ausencia de movilidad y adoptando características típicas de las células mesenquimales, lo que incluye capacidad de invasión, de movilidad y resistencia a la apoptosis (79) (80).

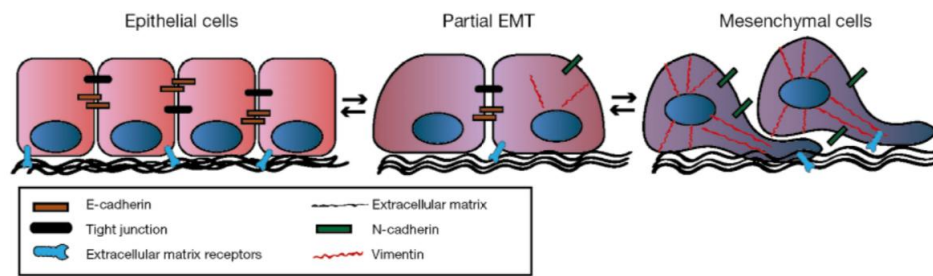


Figura 3. Barrera epitelio-mesenquimal (80).

Esta situación ocurre principalmente en la morfogénesis embrionaria, pero se ha objetivado un importante papel durante la progresión cancerígena. En el proceso de metastatización, las células epiteliales provenientes del tumor primario deben ser capaces de liberarse para poder alcanzar el torrente sanguíneo y así “viajar” hasta otras regiones para producir las metástasis. Pero este proceso es reversible: a pesar de haber adquirido características mesenquimales para conseguir invadir otros órganos, las células deben adoptar características epiteliales nuevamente al colonizarlos. Este nuevo cambio es denominado transición mesenquimo-epitelial (TME) (81). Las células con un alto poder de plasticidad para realizar la transformación epitelio-mesenquimal-epitelial podrían ser las más agresivas facilitando la diseminación y la formación de metástasis (82).

El paso de la TEM potencia la capacidad de las CTC en relación al poder de invasión, de angiogénesis y de supervivencia.

Durante este paso, EpCAM, la E-cadherina y algunas citoquinas sufren una disminución en su expresión, a cambio de un aumento de los marcadores de estirpe mesenquimal como son la vimentina y la N-cadherina. Estas modificaciones impiden la enumeración de las células mediante los métodos basados en la detección de Ep-CAM (83) (79) (84).

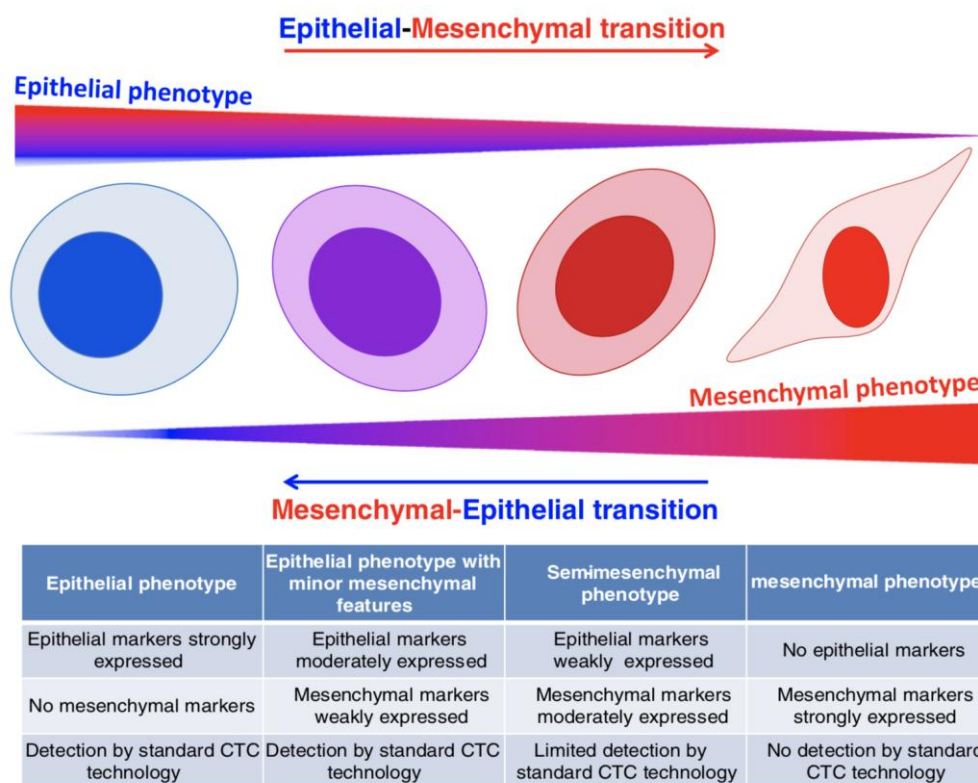


Figura 4. Plasticidad tumoral. Cambios fenotípicos de las CTC al cruzar la TEM (84).

Aunque habitualmente nos referimos a las células tumorales y su aislamiento de forma individual, está descrita ampliamente la presencia de agregados celulares denominados clusters o microémbolos (CTM, circulating tumor microemboli), compuestos por entre 2 y 50 CTCs (81) (85). El grado de aislamiento de estos clusters varía según el método elegido debido a que expresan marcadores mesenquimales y su tamaño es mayor que el de las CTCs. Esta es otra de las razones que dificultan la implantación en la práctica clínica de las CTC.

La determinación de estas CTCs es considerada una biopsia líquida a tiempo real. Aunque la definición de biopsia según la RAE es extracción y examen

de una muestra de tejido tomada de un ser vivo con fines diagnósticos, el término biopsia líquida no sólo incluye a las CTCs, si no que en este marco también se halla el análisis de ADN circulante tumoral (ADNct). El ADNct se libera desde diferentes orígenes, el tumor primario, las mismas CTCs o desde las metástasis (86). Los principales problemas en el aislamiento del ADNct es que la mayoría del ADNc que encontramos en la sangre no procede de células tumorales y su vida media es alrededor de dos horas, lo que obliga a su rápido procesamiento (87).

Al igual que ha ocurrido con las CTCs, múltiples dispositivos han sido desarrollados para detectar el ADNct. Estos métodos puede dividirse en aquellos que se centran en detectar una mutación en un grupo de genes o aquellos que estudian el genoma y detectan alteraciones dentro de éste (88). Con ellos, la intención de los investigadores es detectar dianas terapéuticas y mecanismos de resistencia a los tratamientos.

En relación al CPNCP, en 2014 Douillard et al publicaban su artículo en el que describían la utilidad del ADNct para detectar las mutaciones en EGFR (89).

Múltiples trabajos han centrado su objetivo en comparar la utilidad de las CTCs con la del ADNct. Maheswaran et al analizaron mutaciones en EGFR de CTCs y ADNct obtenidas en enfermos diagnosticados de CPNCP. Describieron que la secuenciación obtenida a través de las CTCs era más sensible que en el ADNct (90).

En cambio, otros grupos defienden la complementaridad de ambas detecciones, obteniendo importante información de ambos métodos (91) (92).

Las potenciales utilidades de la biopsia líquida quedan reflejadas en la figura 5 (88).

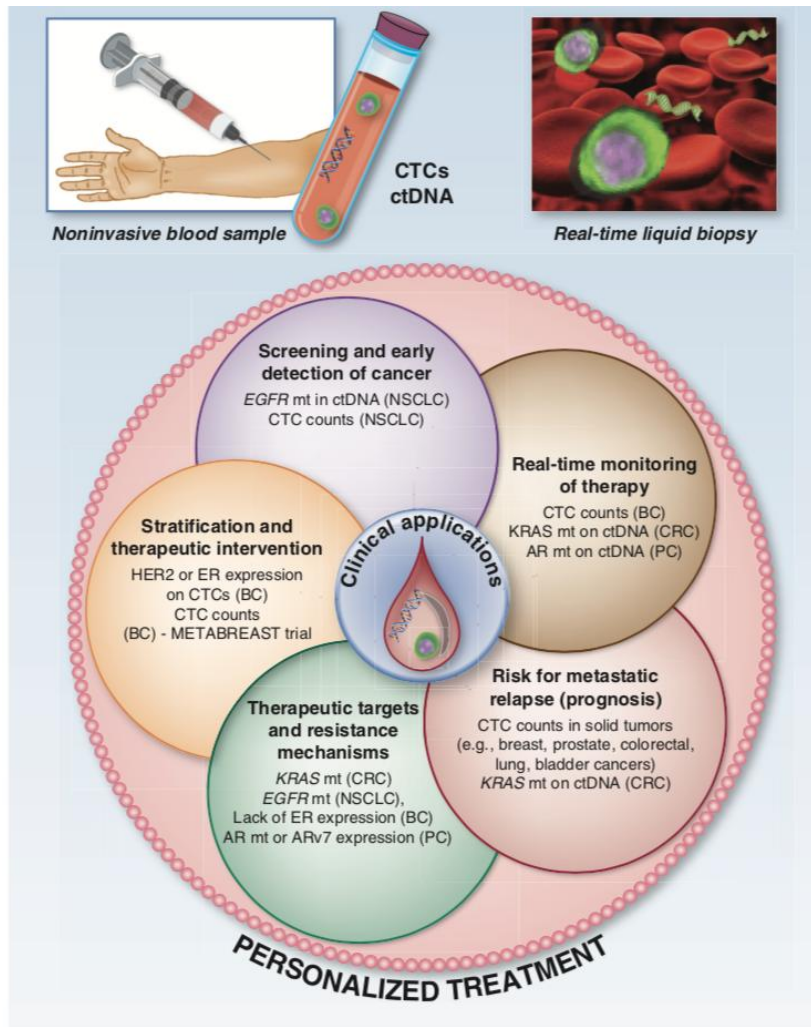


Figura 5. Potenciales utilidades de la biopsia líquida (88).

## ***JUSTIFICACIÓN***



## *JUSTIFICACIÓN*

El CPNCP constituye un grupo de entidades clínicas heterogéneas que comparten orígenes moleculares y celulares, pero difieren en cuanto a curso clínico y pronóstico. Dado el pronóstico aciago a largo plazo con una supervivencia global a 5 años de en torno al 15%, debemos pensar que existen factores pronósticos que aún no conocemos y que nos permitirían estratificar mejor los pacientes de más alto riesgo pudiendo ofrecer así terapias más agresivas en casos seleccionados. Hay una amplia bibliografía en lo que a factores clínicos y patológicos se refiere en este campo sin que esto haya conseguido mejoras sustanciales a nivel pronóstico. Parece por ello razonable que los intentos vayan dirigidos al desarrollo de las técnicas de biología molecular.

El desarrollo de este tipo de técnicas y su inclusión en el diagnóstico rutinario traería consigo una mejoría sustancial del proceso, tanto diagnóstico como de seguimiento, aportaría una estratificación más precisa de los pacientes en grupos pronósticos y ayudaría de esta manera a ofrecer mejoras en los distintos regímenes de tratamiento disponibles para cada uno de los pacientes.

Las células tumorales circulantes son células epiteliales en sangre periférica que expresan EpCAM. La detección y recuento de estas células se ha propuesto como una posible herramienta con implicaciones predictivas y pronósticas en diferentes tipos de tumores, y que también pueden aportar información adicional en pacientes con CPNCP.

Su presencia podría asociar un riesgo aumentado de desarrollar enfermedad

metastásica, ser una evidencia inicial en el desarrollo de este proceso y, por tanto, presentarse como un indicador de mal pronóstico. De un modo similar, ya que existe la capacidad de cuantificar estas células, no sólo de determinar su presencia, podrían ser empleadas para monitorizar la respuesta al tratamiento. El desarrollo de esta técnica también posibilitaría una mejor caracterización del genotipo de las células tumorales del paciente.

Si este campo llegase a tener el suficiente desarrollo podría tener implicaciones traslacionales absolutamente fundamentales a distintos niveles: selección de pacientes candidatos a tratamiento quirúrgico o tratamiento oncológico inicial, selección de pacientes para adyuvancia y pronóstico de pacientes con enfermedad metastásica. El desarrollo de esta técnica también posibilitaría una mejor caracterización del fenotipo y/o genotipo de las células tumorales del paciente, ayudando en el desarrollo de las dianas terapéuticas en una enfermedad con posibilidades terapéuticas limitadas.

Es por lo tanto muy importante la identificación de nuevos factores pronósticos que ayuden a una mejor clasificación de los pacientes y de su necesidad de tratamiento. Si se demostrara la utilidad de la detección de CTC tanto en el proceso diagnóstico como en el seguimiento, se optimizaría la selección de los pacientes y facilitaría la toma de decisiones relacionadas con la mejor opción de tratamiento y cuán de estrecho debería ser el seguimiento a llevar a cabo.

## ***HIPÓTESIS***

## *HIPÓTESIS*

Se parte de la hipótesis de que la detección de CTCs en sangre periférica previa al tratamiento en pacientes con CPNCP, es un factor independiente de mal pronóstico en lo que se refiere tanto a respuesta al tratamiento como a intervalo libre de enfermedad y supervivencia global, respecto a aquellos pacientes en los que no se detectan CTCs.

# ***OBJETIVOS***

## **OBJETIVOS**

1. Analizar la correlación entre la cuantificación de células tumorales circulantes y otras variables pronósticas clásicas como el tamaño tumoral, la afectación ganglionar o el subtipo histológico.
2. Correlacionar los cambios en la cuantificación de las CTCs observados previamente y tras el tratamiento quirúrgico con la respuesta clínica a dicha cirugía con el fin de analizar su valor predictivo de la respuesta al tratamiento.
3. Correlacionar los cambios en la cuantificación de las CTCs observados antes y después del tratamiento quimioterápico con la respuesta clínica y así analizar el valor predictivo de la respuesta al tratamiento.
4. Correlacionar los cambios en la cuantificación de las CTCs observados en el seguimiento de los pacientes con la aparición de recidivas tumorales en pacientes en estadios precoces de CPNCP con el fin de establecer su valor pronóstico.
5. Correlacionar los cambios en la cuantificación de las CTCs observados en el seguimiento de los pacientes en estadios avanzados de CPNCP con la progresión tumoral con el fin de establecer su valor pronóstico.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

Se diseñó un estudio observacional analítico de cohortes prospectivas sin grupo control. La población a estudio se limitó a los pacientes pertenecientes al área de salud número 7 de la Comunidad Autónoma de Madrid. El reclutamiento de los pacientes se realizó en las consultas externas de los Servicios de Cirugía Torácica y de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos. El estudio de las muestras sanguíneas se llevó a cabo en el Servicio de Análisis Clínicos del mismo hospital.

Se determinaron dos grupos:

- 1<sup>er</sup> grupo: pacientes diagnosticados de CPNCP en estadios iniciales comprendidos entre estadio IA y IIIA, según la clasificación de la IASLC.
- 2<sup>o</sup> grupo: pacientes diagnosticados de CPNCP en estadios avanzados, estadio IIIB y IV, según la clasificación de la IASLC.

El reclutamiento de los pacientes intervenidos quirúrgicamente se realizó desde Junio de 2011 hasta Octubre de 2013, con un intervalo mínimo de seguimiento de 18 meses. En el caso de los sujetos en estadios avanzados, el reclutamiento se realizó desde Abril de 2010 a Enero de 2013.

Para la selección de la cohorte se utilizaron como criterios de inclusión:

1. Pacientes intervenidos de un CPNCP en estadios iniciales con intención curativa y pacientes diagnosticados de CPNCP en estadios avanzados catalogados según la 7<sup>a</sup> edición de la IASLC.
2. Edad igual o superior a 18 años.
3. Firma de consentimiento informado.



Los criterios de no inclusión en ambos grupos:

1. Diagnóstico previo de cualquier otra neoplasia, incluyendo carcinomas in situ, sin importar fecha de diagnóstico anterior o tratamiento recibido.

En el grupo de pacientes quirúrgicos, los criterios de exclusión se determinaron como:

1. Resección incompleta del cáncer de pulmón primario.

La resección completa (R0) se define por los siguientes criterios, establecidos por la IASLC: márgenes libres microscópicamente, disección ganglionar sistemática o específica del lóbulo, no afectación ganglionar extracapsular y el ganglio mediastínico más alto resecado es negativo para malignidad (92).

La definición de resección incompleta (R1/R2) se basa en: compromiso de los márgenes de resección quirúrgica, extensión ganglionar extracapsular, ganglios linfáticos positivos para afectación tumoral no extirpados y/o derrame pleural o pericárdico maligno.

La resección “incierto” se describe como: márgenes libres y sin tumor residual, pero la resección no cumple los criterios para resección completa, hay carcinoma in situ en margen bronquial o citología de lavado pleural positivo (72).

2. Ausencia de recogida de todas las muestras sanguíneas.

- Los criterios de exclusión en el grupo de pacientes de estadios avanzados se determinaron como:

1. Pacientes no subsidiarios de tratamiento antineoplásico.
2. Ausencia de recogida de todas las muestras sanguíneas.

Debido a las limitaciones económicas y tras falsos negativos en relación a la histología, se determinó que solo serían incluidos aquellos pacientes que tenían diagnóstico histológico previo a la intervención quirúrgica, aunque no se estableció como criterio de inclusión al inicio del estudio.

La selección de los individuos a estudio se realizó en las consultas de Cirugía Torácica y Oncología Médica de forma consecutiva atendiendo a los criterios de inclusión establecidos previamente.

Ambos proyectos fueron financiados económicamente por becas solicitadas a Fundación Mutua Madrileña (FMM) y a la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT). A pesar del cálculo muestral realizado previamente, la ausencia de una subvención de mayor suma obligó a suspender el reclutamiento de pacientes de ambos grupos antes de alcanzar una  $n$  superior.

Las variables recogidas en el estudio fueron:

Variables sociodemográficas:

- Edad: se midió como variable continua para los datos descriptivos del estudio.
- Género: variable dicotómica. Se determinó 0 como hombre y 1 como mujer.

- Estado de fumador: variable cualitativa. Se dividió en las siguientes categorías:

0. Nunca fumador.
1. Fumador activo.
2. Ex-fumador con menos de 2 años de abandono del hábito tabáquico.
3. Ex-fumador con más de 2 años de abandono del hábito tabáquico.

Variables sociodemográficas
Edad
Sexo
Estado tabáquico

Tabla 5. Variables demográficas.

#### Variables relacionadas con la intervención quirúrgica

- Intervenido: variable dicotómica codificada con el 0 en el caso de no haber sido intervenido y con el 1 en caso contrario.
- Fecha de intervención.
- Tipo de intervención: variable categórica. Los tipos de resecciones pulmonares que se realizaron se codificaron como:
  1. Resección atípica: resección pulmonar de forma no reglada de un fragmento de parénquima afecto por el tumor.
  2. Resección segmentaria típica: resección pulmonar en la que se extirpa uno o más segmentos sin completar un lóbulo pulmonar,

tras sección de la arteria, vena y bronquio segmentario correspondiente.

3. Lobectomía/Bilobectomía: resección pulmonar mayor en la que se extirpa uno o dos lóbulos afectados por la lesión tras sección de la arteria, vena y bronquio lobar correspondiente.

4. Neumonectomía: resección pulmonar mayor en el que se resecta la totalidad del pulmón donde se localiza el cáncer tras sección de arteria pulmonar principal del lado correspondiente así como las venas y bronquio.

9. Si no fue intervenido.

- Linfadenectomía: variable dicotómica, codificada siendo 0 si no se realizó linfadenectomía y 1 para cuando sí se realizó.

- Tipo de linfadenectomía: variable categórica. Se categorizó en:

0. Ninguna.

1. Biopsia ganglionar: Se define como biopsia la extirpación o la toma de uno o varios ganglios pulmonares y mediastínicos, sin intención de hacer un muestreo de todas las estaciones ganglionares (93).

2. Muestreo ganglionar: extirpación de ganglios linfáticos de un cierto número preestablecido de estaciones ganglionares pulmonares y mediastínicas según localización del tumor (93).

3. Disección ganglionar sistemática: la extirpación de todos los ganglios en todas las estaciones ganglionares del pulmón y del mediastino del lado en el que se localiza la lesión (93).

9. No procede.

<b>Variables quirúrgicas</b>
Intervenido
Fecha intervención
Tipo intervención
Linfadenectomía
Tipo Linfadenectomía

Tabla 6. Variables quirúrgicas.

### Variables relacionadas con el tumor

El estudio anatomopatológico de todas las muestras histológicas fue realizado por el servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital.

- Tipo histológico: variable categórica. Codificada con:
  1. Adenocarcinoma.
  2. Epidermoide.
  3. Otros.
- Grado de diferenciación: variable categórica. Los grados de diferenciación recogidos en este estudio y según la American Joint Comission on Cancer (AJCC) (17) corresponderían a:
  1. G1 bien diferenciado.
  2. G2 moderadamente diferenciado.
  3. G3 mal diferenciado.
  4. GX indeterminado.
- T clínico: variable categórica definida según la 7ª edición de la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC). Se

clasificó en:

1. cT1.
2. cT2.
3. cT3.
4. cT4.

- N clínico: variable categórica definida según la 7ª edición de la IASLC.

Se clasificó en:

0. cN0.
1. cN1.
2. cN2.
3. cN3.

- M clínico: variable categórica definida según la 7ª edición de la IASLC.

0. cM0.
1. cM1.
9. Desconocido.

- T patológico: variable categórica definida según la 7ª edición de la IASLC.

1. pT1.
2. pT2.
3. pT3.
4. pT4.

- N patológico: variable categórica definida según la 7ª edición de la IASLC.

0. pN0.
1. pN1.

- 2. pN2.
- 3. pN3.
- M patológico: variable categórica definida según la 7ª edición de la IASLC.
  - 0. pM0.
  - 1. pM1.
  - 9. Desconocido.
- Estadio clínico: variable categórica definida según la 7ª edición de la IASLC.
  - 1. Ia.
  - 2. Ib.
  - 3. IIa.
  - 4. IIb.
  - 5. IIIa.
  - 6. IIIb.
  - 7. IV.
- Estadio patológico: variable categórica definida según la 7ª edición de la IASLC.
  - 1. Ia.
  - 2. Ib.
  - 3. IIa.
  - 4. IIb.
  - 5. IIIa.
  - 6. IIIb.
  - 7. IV.

- Número de ganglios aislados: variable continua que determina el número total de ganglios, tanto afectados como libres de tumor, obtenidos durante la cirugía.
- Número de ganglios aislados en territorios N1, localizados en las regiones 10R, 10L, 11R y 11L: variable continua que determina el número total de ganglios N1, tanto afectados como libres de tumor, obtenidos durante la cirugía (94).
- Número de ganglios aislados N1 positivos para metástasis, localizados en las regiones 10R, 10L, 11R y 11L: variable continua que determina el número total de ganglios N1 afectados obtenidos durante la cirugía (94).
- Número de ganglios aislados en territorios N2, localizados en las regiones 2R, 2L, 3, 4R, 4L, 5, 6, 7, 8R, 8L, 9R y 9L: variable continua que determina el número total de ganglios N2, tanto afectados como libres de tumor, obtenidos durante la cirugía (94).
- Número de ganglios aislados N2 positivos para metástasis, localizados en las regiones 2R, 2L, 4R, 4L, 5, 6, 7, 8R, 8L, 9R y 9L: variable continua que determina el número total de ganglios N2 afectados, obtenidos durante la cirugía (94).



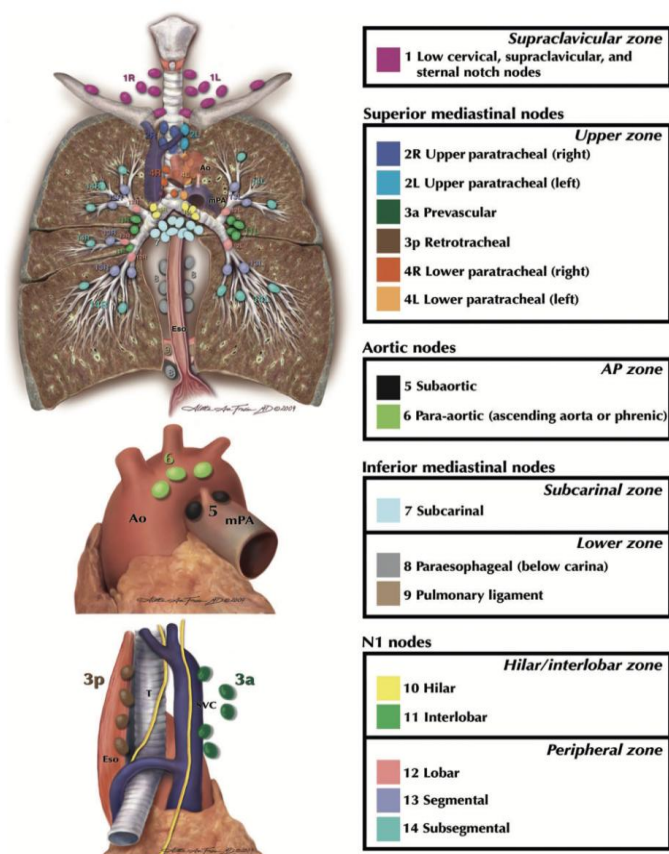


Figura 6. Mapa ganglionar IASLC (94).

Variables tumorales
Tipo histológico
Grado diferenciación
cTNM
pTNM
Nº ganglios aislados
Nº ganglios N1
Nº ganglios N1+
Nº ganglios N2
Nº ganglios N2+

Tabla 7. Variables tumorales.

### Variables relacionadas con la determinación de CTC:

La presencia de CTCs se definió como el aislamiento de una o más CTCs por muestra extraída.

- CTC 1ª muestra (M1): células determinadas antes del inicio del tratamiento, tanto quirúrgico como quimioterápico: variable continua.
- CTC 2ª muestra (M2): Variable continua.
  - i. En pacientes intervenidos, células aisladas en la muestra extraída al año de la cirugía.
  - ii. En pacientes en tratamiento oncológico, células aisladas en la muestra extraída en la reevaluación, tras el primer ciclo de QT y previa al 2º ciclo.
- CTC 3ª muestra (M3): Variable continua. Muestra sanguínea extraída únicamente en los pacientes intervenidos, a los 2 años de la intervención quirúrgica.
- CTC recidiva (MR): Variable continua. Muestra extraída únicamente en los pacientes sometidos a cirugía que presentaron recidiva en el momento del diagnóstico de ésta.

### Variables relacionadas con el seguimiento

- Recidiva: variable dicotómica. Se codificó la ausencia de recidiva con el 0 y con el 1 la presencia.
- Fecha recidiva/progresión: fecha de la prueba de imagen que constataba la presencia de recidiva o progresión tumoral.
- Tipo de recidiva o progresión tumoral: variable categórica. Se definió:
  - 0. No recidiva.
  - 1. Local: cuando la aparición de la nueva lesión se produce en la

misma zona donde se encontraba el tumor primario.

2. Regional: afectación tumoral de los ganglios hiliares o mediastínicos.

3. A distancia: aparición de metástasis en otras partes del cuerpo.

- Mortalidad global: variable dicotómica. Codificado con el 0 para paciente vivo, y el 1 para paciente fallecido.
- Mortalidad por cáncer: variable dicotómica. Se definió como aquella que ocurrió en pacientes que presentaron alguna complicación relacionada con la presencia de recidiva tumoral o progresión. Fallecimiento no relacionado con el tumor codificado con el 0, y codificado con el 1 en los pacientes fallecidos relacionados con el cáncer.
- Fecha de último contacto: última fecha en la que se reporta contacto médico con el paciente o fecha de exitus.
- Quimioterapia adyuvante: variable dicotómica. Los pacientes que no recibieron QT adyuvante fueron determinados con el 0, y con el 1 los que sí recibieron.
- Radioterapia adyuvante: variable dicotómica. Los pacientes que no recibieron RT adyuvante se determinaron con el 0, y con el 1 los que sí recibieron.

Variables seguimiento
Recidiva/progresión
Fecha recidiva/progresión
Tipo recidiva/progresión
Mortalidad global
Mortalidad por cáncer
Fecha último contacto
Quimioterapia adyuvante
Radioterapia adyuvante

Tabla 8. Variables seguimiento.

## METODOLOGÍA

La información demográfica y quirúrgica, así como los resultados de anatomía patológica y de las pruebas radiológicas se recogieron a través de la historia clínica del enfermo registrada en el Hospital Clínico San Carlos y en el centro de salud correspondiente a cada paciente, a través tanto de su formato en papel como los datos virtuales. La base de datos del Servicio de Análisis Clínicos fue usada como fuente de información para obtener el número de CTC aisladas en cada una de las muestras.

Toda la información ha sido recogida únicamente por la doctoranda e introducida en una base de datos a partir de la cual se realizó el estudio estadístico.

Todos los pacientes diagnosticados en estadios precoces fueron sometidos a intervención quirúrgica por parte del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital

Clínico San Carlos. Asimismo los pacientes en estadios avanzados fueron tratados por el Servicio de Oncología Médica del mismo hospital.

El tratamiento quimioterápico utilizado en los casos de estadios avanzados consistió en una pauta doble basada en platino con antiangiogénicos o en platinos con antifolato.

La recogida de muestras (muestra = 10 ml de sangre periférica) se realizó por personal de enfermería entrenado, siguiendo el mismo protocolo de extracción y manejo de las muestras en todos los casos.

El procedimiento de extracción que se siguió en la recogida de todas las muestras analizadas fue:

- Primera extracción de 10 ml de sangre periférica, desechando esta muestra para evitar la contaminación de células epiteliales.
- Segunda extracción de 10 ml de sangre periférica, conservando en tubos CellSaver® máximo 72 horas a temperatura ambiente

En el caso de los pacientes en estadios precoces las extracciones de sangre se realizaron según el siguiente cronograma (tabla 9):

- Primera muestra antes del acto quirúrgico en el quirófano correspondiente, una vez el paciente ya había sido sometido a anestesia general.
- Segunda muestra a los 12 meses de la cirugía.
- Tercera muestra a los 24 meses de la cirugía.
- Muestra en el momento de la recidiva si se produjera.

Las últimas tres muestras referidas fueron extraídas en las consultas externas de Cirugía Torácica en el mismo hospital o en su defecto en el Centro de Especialidades de Modesto Lafuente.

En pacientes con diagnóstico de estadio avanzado el calendario de extracción fue:

- Primera muestra: antes de recibir el primer ciclo de QT.
- Segunda muestra: coincidiendo con la primera reevaluación de la enfermedad tras haber recibido el primer ciclo de tratamiento y previo al 2º ciclo.

Ambas muestras fueron extraídas en las consultas externas de Oncología Médica o en el hospital de día dependiente de esta especialidad.

<b>Muestras extraídas</b>	<b>Precoces</b>	<b>Avanzados</b>
1ª Muestra	Pre-cirugía	Previo 1 <sup>er</sup> ciclo
2ª Muestra	1 año tras cirugía	Previo 2º ciclo
3ª Muestra	2 años tras cirugía	X
Muestra recidiva	Tras recidiva	X



Tabla 8. Calendario extracción.

Todas las muestras se conservaron en los tubos Cellsaver®. Estos tubos permiten la preservación de las células durante un máximo de 72 horas a temperatura ambiente sin alterar sus características. Las muestras de sangre periférica obtenidas se analizaron en el laboratorio de Genómica / Unidad de CTCs, ubicado en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos en un sistema semiautomático, en el CellTrack® AutoPrep System. Este dispositivo permite identificar por fluorescencia las células epiteliales marcadas con los anticuerpos anti-EpCAM (anticuerpos frente a la molécula de adhesión de la célula epitelial) y anti-citoqueratina con fluoresceína y la tinción para ácidos nucleicos (DAPI). Los leucocitos, al ser células nucleadas y teñirse con DAPI, se distinguen mediante el anti-CD45 marcado con

fluoresceína, siendo excluidos en la valoración de CTCs. Los resultados son analizados por el analizador celular. La obtención de las imágenes generadas a través de microscopía electrónica en el CellTracks Analyzer II, fueron interpretadas por dos investigadores expertos formados específicamente en la identificación de células tumorales con experiencia previa en la identificación de este tipo de células (figura 7). Las características determinantes de las CTCs están recogidas en la tabla 9.

Marcador	Características CTCs
Ep-CAM	+
Citoqueratinas	+
CD45	-
DAPI	+
Tamaño	> 4 $\mu\text{m}$

Tabla 9. Características CTCs.

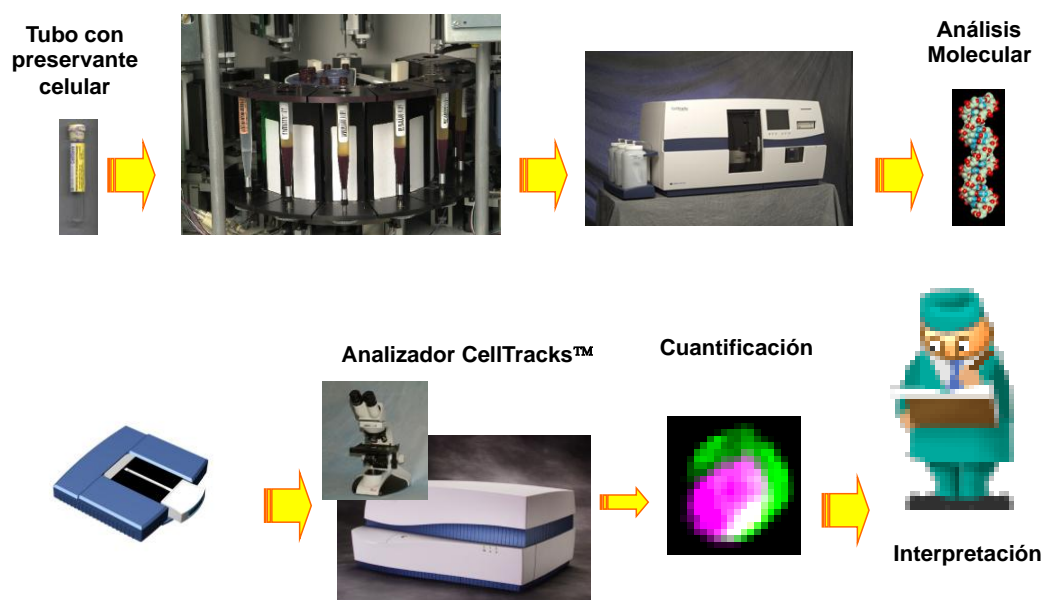


Figura 7. Proceso detección y aislamiento con CellSearch®

A pesar del desarrollo de múltiples técnicas para la determinación de CTCs, el sistema utilizado en este proyecto es el único validado por la FDA para el aislamiento de estas células.

El presente estudio obtuvo la aprobación del Comité Ético del Hospital Clínico San Carlos. Durante todo el procedimiento se aseguró la confidencialidad de los datos identificando a cada paciente con el número de ingreso en el estudio.

Todos los pacientes incluidos en el estudio, tanto en estadios precoces como avanzados, firmaron el consentimiento informado.

El análisis estadístico fue realizado por la Unidad de Metodología de la Investigación y Epidemiología Clínica del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa SPSS versión 20 (IBM SPSS, Inc., EEUU).

Se realizó el análisis descriptivo de la muestra y de las variables relacionadas con los tumores, tipo de tratamiento recibido (cirugía/QT) y CTCs. Las variables continuas se representaron con media y desviación estándar en caso de presentar una distribución normal. Las variables continuas que presentaron una distribución no normal fueron representadas con mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas fueron representadas con su frecuencia. Las variables continuas fueron comparadas utilizando la T de Student para variables normales y la U de Mann-Whitney para no normales. En cuanto a las variables categóricas se utilizó la prueba de  $X^2$ , siempre que las frecuencias esperadas fueran mayores de 5. En caso contrario, se utilizó la prueba exacta de Fisher.

Valores de  $p \leq 0,05$  (bilaterales) se consideraron significativos.



Para el análisis estadístico de la probabilidad de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre las curvas de supervivencia se examinaron por el método de Log-Rank. Para los cálculos de la supervivencia y del intervalo libre de enfermedad, se consideró el tiempo transcurrido entre el momento de la intervención quirúrgica y la fecha de la última revisión o fallecimiento, o la fecha de la recidiva o progresión tumoral respectivamente.

### **Limitaciones del estudio**

Debido al pequeño tamaño muestral de nuestro estudio, condicionado por la limitación económica que restringe las determinaciones analizadas, 53 pacientes, repartidos en 2 grupos, 25 y 28 sujetos, el análisis estadístico no permite extraer conclusiones categóricas en la relación de las CTCs con el pronóstico de la enfermedad.

La dificultad en el reconocimiento de las células tumorales por parte del dispositivo CellSearch®. Esta dificultad está motivada por las variaciones en la membrana celular, el bajo número respecto a otras células hematológicas y la presencia de clusters. Esto puede provocar la no detección de CTC presentes en los pacientes.

La ausencia de un grupo control en nuestro estudio. Este grupo podría haber estado compuesto por pacientes con enfermedad benignas como neumotórax y por sujetos sanos, y su ausencia nos impide determinar si se pueden hallar CTCs en pacientes no afectados por CPNCP. De la misma manera no podemos definir si la presencia de CTCs en estos casos pudiera tener algún valor pronóstico o influencia en otras variables.

## ***RESULTADOS***

## RESULTADOS

Entre el 29 de Abril de 2010 y el 7 de Octubre de 2013 se reclutaron 89 pacientes diagnosticados de CPNCP. Se excluyeron 36 pacientes: 6 por razones histológicas (no malignidad de la muestra o diagnóstico de otro tumor no CPNCP), 6 perdidos en el seguimiento, 4 por incidencias en la extracción de la muestra sanguínea, 10 por error en el procesamiento de las primeras muestras y 10 por *exitus* previo a la extracción de las muestras necesarias. Finalmente 53 pacientes fueron válidos para la inclusión en el estudio.

Este reclutamiento se llevó a cabo en dos fases en función de la estadificación del tumor. Así, entre el 1 de Junio de 2011 y el 7 de Octubre de 2013 se reclutaron 42 pacientes diagnosticados de CPCNP en estadios precoces (I-IIIa según la 7ª edición del TNM). 28 de los pacientes reclutados cumplieron todos los requisitos para ser incluidos en el estudio. De los 14 pacientes restantes, 6 fueron excluidos por razones histológicas, 2 por error en el procesamiento de primeras muestras y 6 perdidos en el seguimiento, quedando resumido en la figura 8.

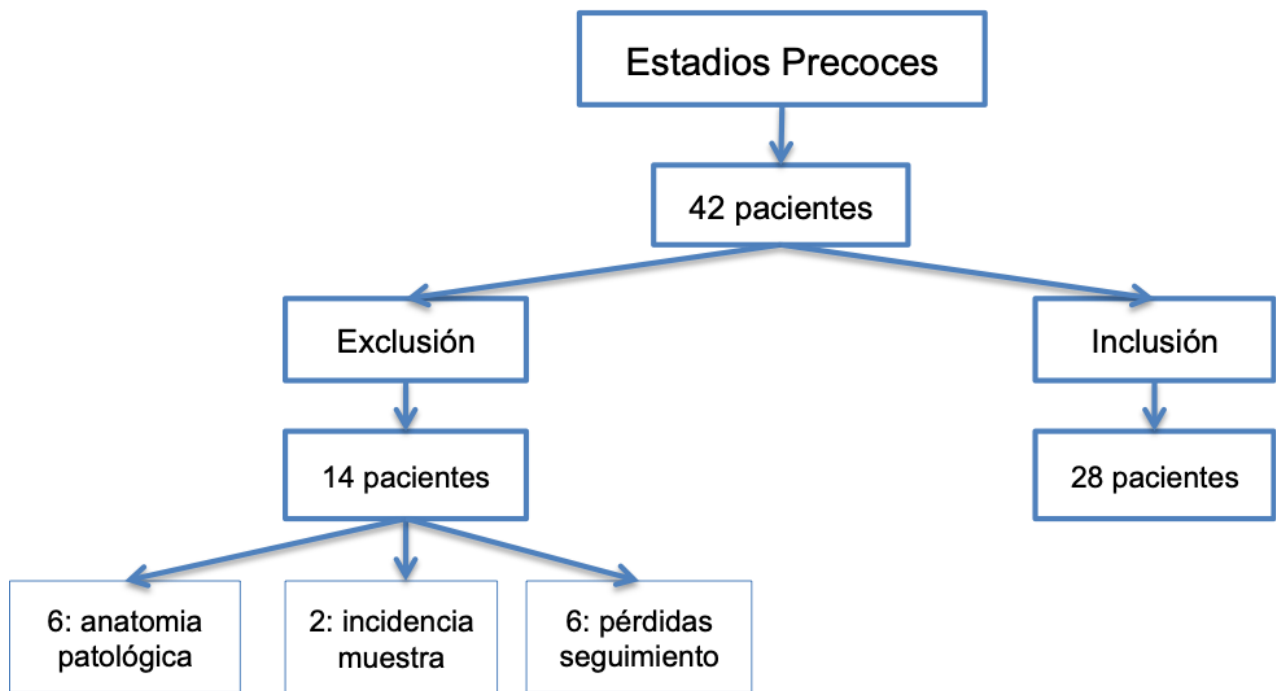


Figura 8. Reclutamiento estadios precoces.

Se reclutaron 47 pacientes diagnosticados de CPNCP en estadios avanzados, IIIB y IV, entre el 29 de Abril de 2010 y el 9 de Enero de 2013.

Cuatro pacientes se excluyeron por incidencias en la extracción de la muestra sanguínea y 18 por no poder obtener la segunda muestra sanguínea por *exitus* del paciente o anulación de la primera muestra por el procesador.

Finalmente 25 pacientes en estadios avanzados fueron incluidos en el estudio, quedando resumido en la figura 9.

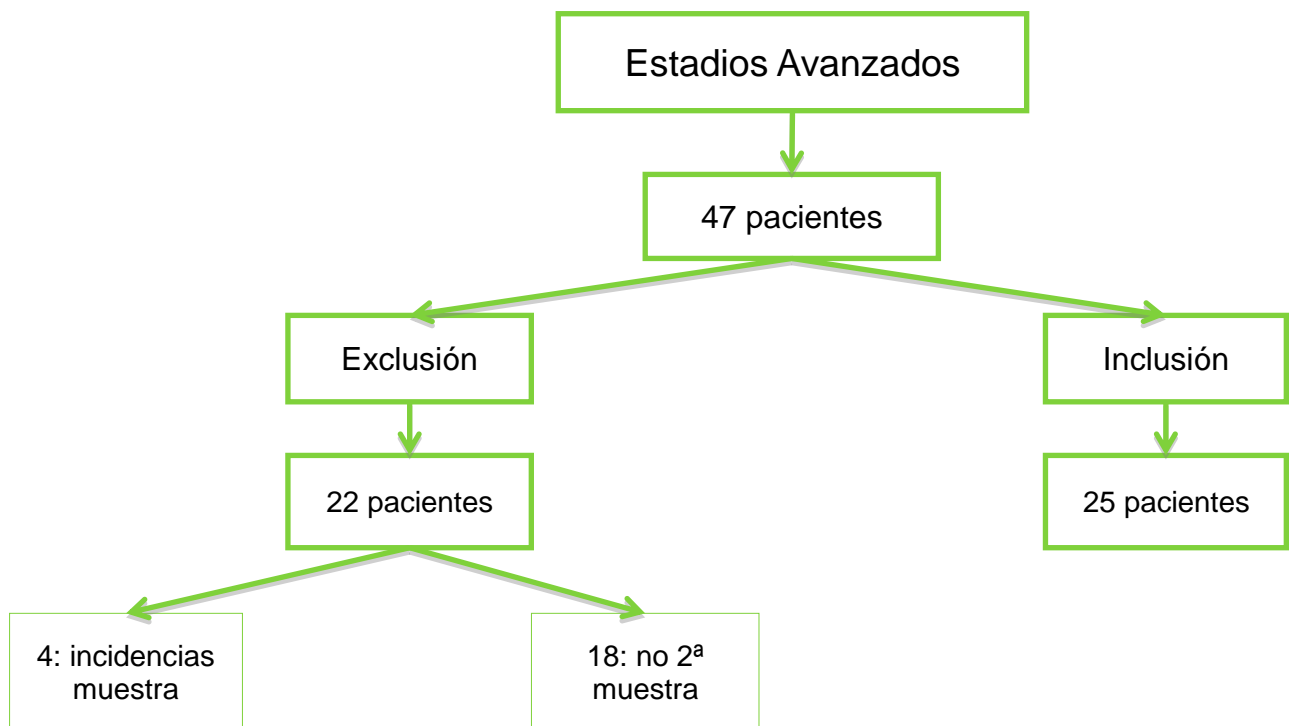


Figura 9. Reclutamiento estadios avanzados.

La distribución por sexo es de 38 varones (72%) y 15 mujeres (28%).

Catorce pacientes eran fumadores activos en el momento de la inclusión. El grupo ex-fumadores de menos de dos años se componía de 7 pacientes y el de más de dos años de 27 pacientes. Cinco de los pacientes nunca habían sido fumadores activos.

Las características sociodemográficas del grupo de estadio precoz se recogen en la tabla 10 y las relacionadas con el grupo de estadio avanzado en la tabla 11.

Edad expresada en años, con su mediana y rango intercuartílico (p25-75).

Variable sociodemográficas		n (%)
Edad*		67 (58-71)
Sexo	Varón	17 (60,7)
	Mujer	11 (39,3)
Hábito tabáquico	Nunca fumador	4 (14,3)
	Fumador activo	4 (14,3)
	Exfumador ≤ 2 años	4 (14,3)
	Exfumador > 2 años	16 (57,1)

\*Edad expresada en años, con su mediana y rango intercuartílico (p25-75).

Tabla 10. Variables sociodemográficas del grupo en estadios precoces.

Variable sociodemográficas		n (%)
Edad		67 (57-76)
Sexo	Varón	21 (84,0)
	Mujer	4 (16,0)
Hábito tabáquico	Nunca fumador	1 (4,0)
	Fumador activo	10 (40,0)
	Exfumador ≤ 2 años	3 (12,0)
	Exfumador > 2 años	11 (44,0)

\*Edad expresada en años, con su mediana y rango intercuartílico (p25-75).

Tabla 11. Variables sociodemográficas del grupo avanzado.

Ambos grupos presentaban variables sociodemográficas de similar distribución.

En la categoría de estadio precoz encontramos 28 pacientes que fueron sometidos a intervención quirúrgica. En la categoría de avanzados, los 25 pacientes se sometieron a tratamiento oncológico basado en QT acompañada o no de RT.

En el grupo de los pacientes operados se llevaron a cabo 4 resecciones atípicas, 3 resecciones segmentarias y 21 lobectomías/bilobectomías. No se realizó ninguna neumonectomía en pacientes de nuestro estudio.

En relación al tipo de linfadenectomía, a 23 de los pacientes intervenidos se les realizó una disección sistemática del mediastino y a los 5 restantes una

biopsia ganglionar. Ningún sampling ganglionar sistemático fue realizado en este grupo de pacientes.

La tabla 12 refleja las características en relación con las variables quirúrgicas.

Variables quirúrgicas		n (%)
Tipo resección pulmonar	Wedge	4 (14,3)
	Segmentaria	3 (10,7)
	Lobectomía/bilobectomía	21 (75)
Tipo linfadenectomía	Biopsia ganglionar	5 (17,9)
	Sistemática	23 (82,1)

Tabla 12. Variables quirúrgicas en el grupo en estadios precoces.

El tipo histológico más frecuente fue el adenocarcinoma en el 73,6% de los casos. Un 11,3% correspondía a la estirpe de carcinoma epidermoide y el 15,1% a otros tipos histológicos. Ningún carcinoma epidermoide fue registrado en el grupo de los pacientes en estadios avanzados.

El grado de diferenciación sólo pudo establecerse en los 32 pacientes en los que se obtuvo biopsia/pieza quirúrgica. Los tumores bien diferenciados (G1) correspondieron al 28,1% de las muestras. El grado de diferenciación G2 fue el más habitual en 17 de los casos, el 53,1%. Sólo 6 casos presentaron un grado G3 de diferenciación.

La estadificación clínica del tumor se realizó en 52 pacientes, con una pérdida. En las categorías T1 y T2 se agruparon 18 casos en cada una. El grupo T3 estaba compuesto por 5 pacientes y 11 en el caso de T4.

Con respecto a la afectación clínica de los ganglios linfáticos encontramos los siguientes valores: 28 individuos en el grupo N0, 4 en N1, 6 en N2 y 15 en N3.

La presencia de metástasis a distancia se detectó en un 43,4% de los

pacientes, lo que corresponde un estadio IV, que resultó ser el estadio clínico más frecuente.

La estadificación patológica únicamente se realizó en los pacientes intervenidos quirúrgicamente.

En la categoría pT1 se observaron 8 pacientes. El grupo pT2 fue el más frecuente con el 57,1% de los sujetos. En el caso de pT3 y pT4 se hallaron 2 casos en cada rama.

La ausencia de afectación patológica linfática, pN0, se observó en 23 de los pacientes. Sólo 3 presentaron pN1 y únicamente 2 en el caso de pN2.

Ninguno de los pacientes intervenidos quirúrgicamente presentó metástasis en el momento del diagnóstico o de la intervención quirúrgica.

Con respecto a la estadificación patológica, 28,6% de los pacientes pertenecían al estadio IA, 10 casos en el IB, 4 en el caso del IIA, sólo 1 individuo en el IIB y en el IIIA se encontraron 5 enfermos.

La tabla 13 detalla las variables tumorales del grupo de pacientes intervenidos y la tabla 14 refleja aquellas de los pacientes tratados únicamente con QT/RT.



Variables tumorales		n (%)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	19 (67,9)
	Epidermoide	6 (21,4)
	Otros	3 (10,7)
Grado diferenciación	G1	8 (28,6)
	G2	16 (57,1)
	G3	3 (10,7)
	Desconocido	1 (3,6)
pT	T1	8 (28,6)
	T2	16 (57,1)
	T3	2 (7,1)
	T4	2 (7,1)
pN	N0	23 (82,1)
	N1	3 (10,7)
	N2	2 (7,1)
pTNM	Ia	8 (28,6)
	Ib	10 (35,7)
	Ila	4 (14,3)
	IIb	1 (3,6)
	IIla	5 (17,9)

Tabla 13. Variables tumorales en el grupo en estadios precoces.

Variables tumorales		n (%)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	20 (80,0)
	Otros	4 (16,0)
	Desconocido	1 (4,0)
cT	T1	5 (20,0)
	T2	5 (20,0)
	T3	3 (12,0)
	T4	11 (44,0)
cN	N0	5 (20,0)
	N1	5 (20,0)
	N2	15 (60,0)
cM	M0	1 (4,0)
	M1	23 (92,0)
	Desconocido	1 (4,0)
cTNM	IIIb	2 (8,0)
	IV	23 (92,0)

Tabla 14. Variables tumorales en el grupo en estadios avanzados.

La mediana de ganglios linfáticos aislados en los pacientes intervenidos fue de 16, con un rango de 10 a 26 ganglios.

La mediana de ganglios de las regiones N1 extirpados fue de 7, con un rango de 5 a 10 ganglios N1 aislados.

Sólo 5 pacientes presentaron afectación patológica de ganglios N1, con un mínimo de 1 ganglio afecto y una máximo de 4.

La mediana de ganglios de las regiones N2 extirpados fue de 8, con un rango de 5 a 15 ganglios.

El máximo de ganglios N2 positivos fue de 1, con solo 2 pacientes afectados.

Durante el seguimiento, 11 de los pacientes del grupo de estadio precoz presentaron recidiva tumoral. En el grupo de estadio avanzado, 21 pacientes sufrieron progresión de su enfermedad.

En los pacientes operados, 7 de los casos presentaron recidiva a nivel local, siendo ésta la más frecuente. De estos 7 pacientes, a 3 de ellos se les realizó una lobectomía, 2 de ellos una resección segmentaria y a los dos restantes una resección atípica. Únicamente en 2 casos se halló recidiva ganglionar, al igual que a distancia. Esta distribución queda reflejada en la figura 10.



Figura 10.

En el grupo de los pacientes en estadio avanzado, el tipo de progresión de enfermedad más frecuente fue a distancia, un 52%, seguido de afectación local en 6 casos y solo 2 en progresión a nivel ganglionar. La figura 11 muestra esta distribución.



Figura 11.

Siete pacientes recibieron tratamiento adyuvante basado en QT. La RT adyuvante solo fue administrada a 1 paciente.

Al finalizar el tiempo de seguimiento, la mortalidad global ascendía al 54,7 % de los enfermos, 29 pacientes, de los cuales 23 pertenecían al grupo de enfermedad avanzada y 6 en el grupo precoz.

La mortalidad relacionada con el cáncer se presentó en 17 de los casos, representando el 32,1%, 15 clasificados como avanzados y tan sólo 2 en el grupo de precoces. Un total de 12 pacientes fallecieron por otras causas.

Puede observarse en la tabla 15.

Grupo	Mortalidad Global n (%)	Mortalidad Cáncer n (%)
Precoces (28 pacientes)	6 (11,3)	2 (3,77)
Avanzados (25 pacientes)	23 (43,4)	15 (28,3)
Total (53 pacientes)	29 (54,7)	17 (32,1)

Tabla 15. Mortalidad global y relacionada con cáncer.

La mediana de SG de los 53 pacientes fue de 28 meses (figura 12).

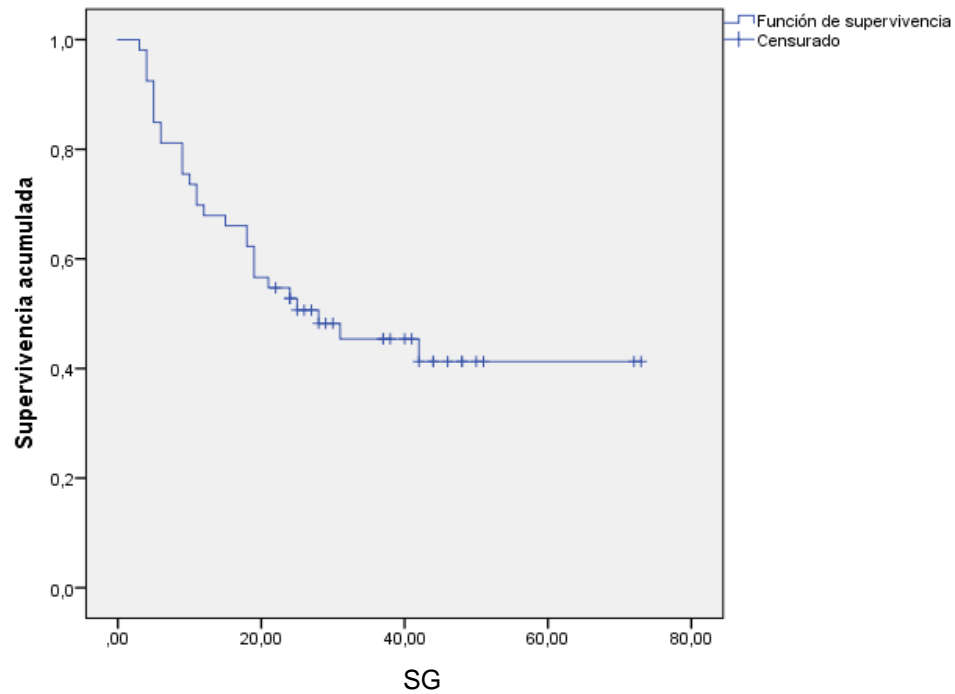


Figura 12. Curva Kaplan Meier SG.

La mediana de SLE del grupo global fue de 17 meses. La curva de SLE queda reflejada en la figura 13.

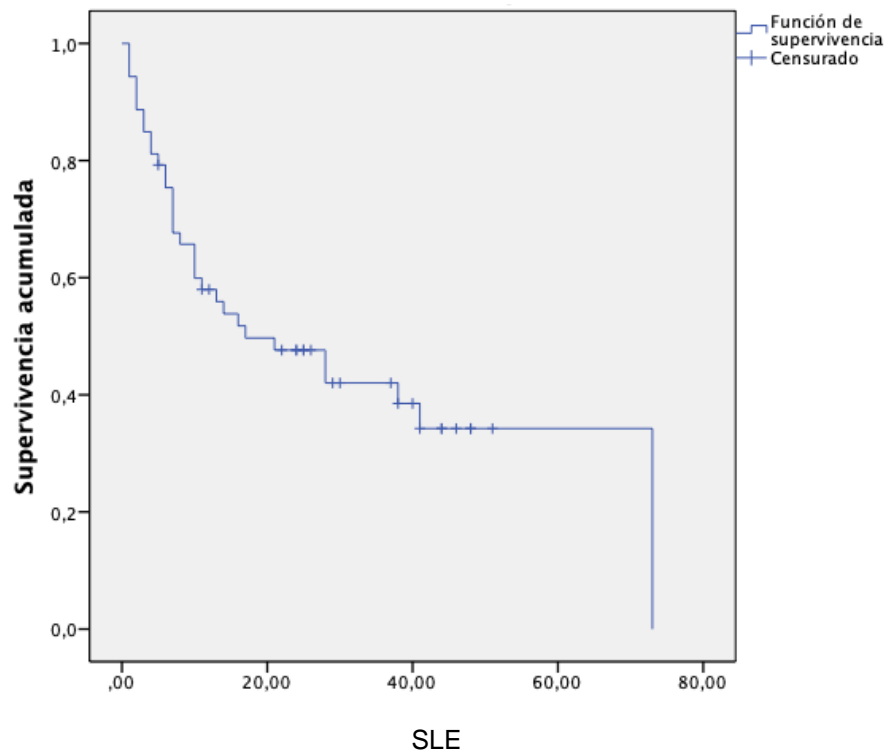


Figura 13. Curva Kaplan Meier SLE.

La mediana de SG en el grupo de avanzados fue de 10 meses. La mediana de SLP presentada fue de 7 meses en los pacientes no operados.

La mediana de SG en el grupo de pacientes en estadios precoces no se alcanzó. A los 42 meses la SG era del 71% y a los 41 meses la SLE era del 54,2%.

La SG de los dos grupos, separadamente, se observa en la figura 14.

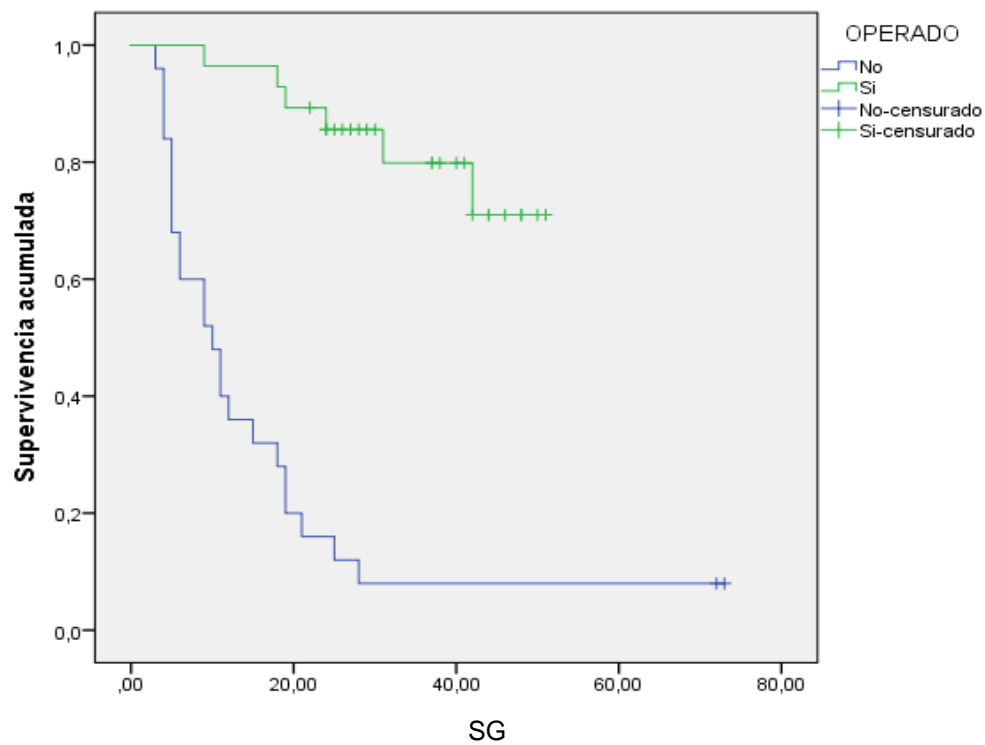


Figura 14. Curva SG por grupos.

La figura 15 refleja la SLE y SLP de ambos grupos de forma independiente.

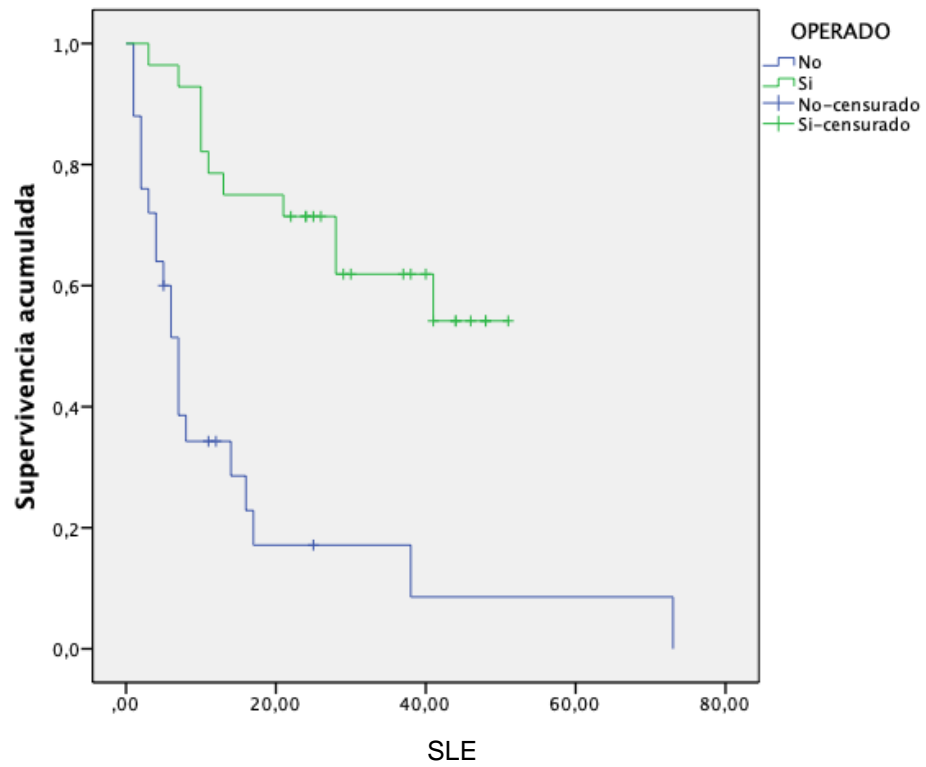


Figura 15. Curva SLE por grupos.

### **Resultados globales en relación a CTCs**

Se analizaron 53 muestras pretratamiento, 46 segundas muestras, 20 muestras extraídas a los dos años del tratamiento y sólo 9 en situación de recidiva. Las muestras M3 y MR solo fueron extraídas en pacientes operados. En el análisis global, incluyendo los 53 pacientes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables sociodemográficas (sexo, edad o hábito tabáquico) o tumorales (cT, cN, histología y grado de diferenciación) en función de la presencia de CTCs en la primera muestra.

No se observaron diferencias entre el porcentaje de pacientes con disminución de CTCs entre la M2 y la M1 en función del grupo al que pertenecían (precoces/avanzados) ( $p=0,179$ ). De los pacientes en los que se observó disminución de CTCs, la mediana de disminución fue de 4 (2,25-16) en los no sometidos a cirugía y de 4 (1-7,25) en los operados.



Al comparar la SG de todos los pacientes en los que se aislaron CTCs en la muestra pre-tratamiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,329$ ) con los pacientes en los que dicha determinación fue negativa con una mediana de SG en los que sí se aislaron células de 19 meses y de 42 meses en los que no se detectaron CTCs (figura 16).

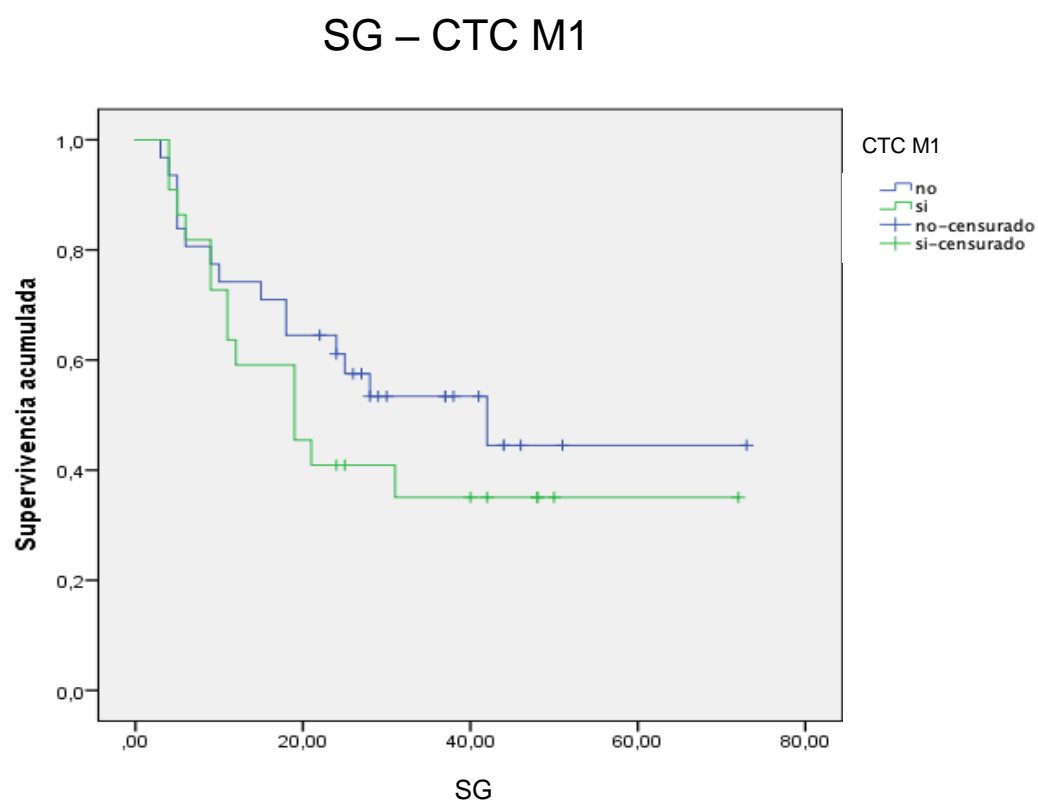


Figura 16. SG según presencia de CTCs en M1.

La mediana de SLE de los pacientes con presencia de CTCs en su M1 fue de 13 meses, mientras que en los pacientes con ausencia de éstas fue de 41 meses. A pesar de esta SLE más larga, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,202$ ) (figura 17).

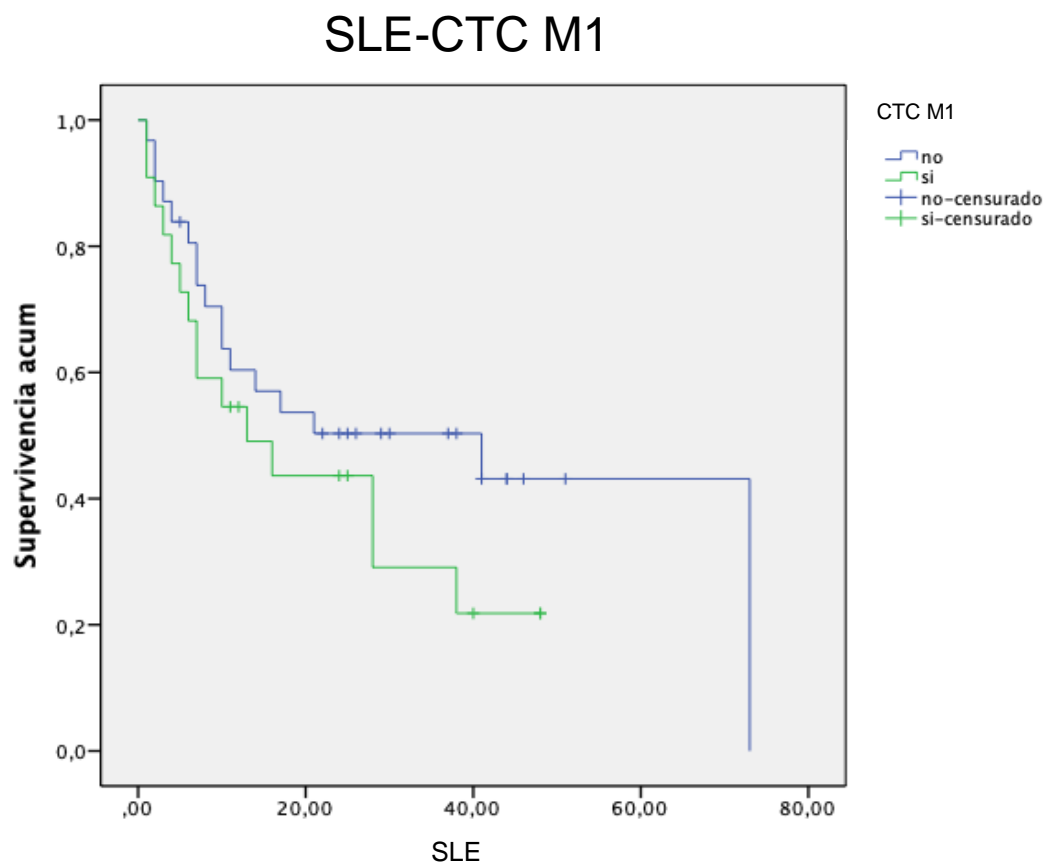


Figura 17. SLE según presencia de CTCs en M1.

El análisis de la mediana de SG en los pacientes que presentaron disminución en el número de CTC objetivó una supervivencia de 42 meses. Los pacientes que no sufrieron disminución de las células en la segunda muestra tuvieron una mediana de SG de 19 meses (figura 18).

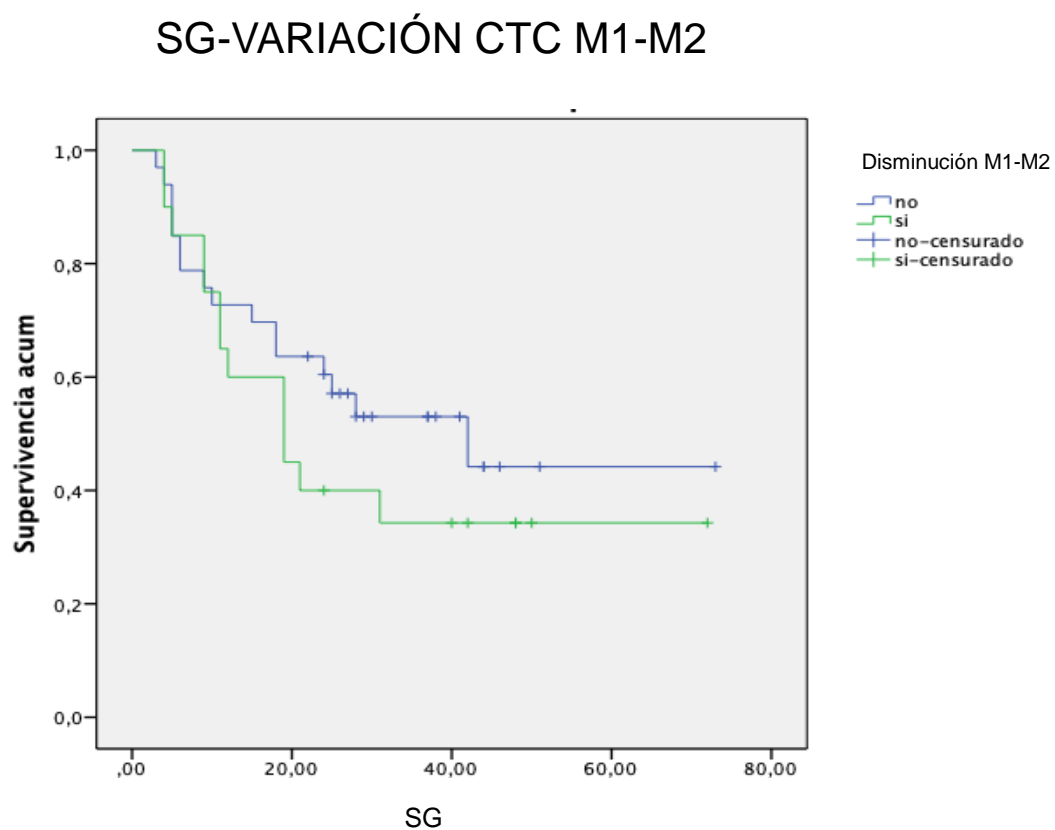


Figura 18. SG según variaciones entre M1 y M2

Se calculó la mediana de SLE para los pacientes que no presentaron disminución de la cifra de CTC entre las dos primeras muestras, siendo de 13 meses. Por el contrario, la mediana en los que sí decreció fue de 41 meses, si bien no se observaron diferencias en la distribución de las curvas de SLE entre ambos grupos ( $p=0,201$ ) (figura 19).

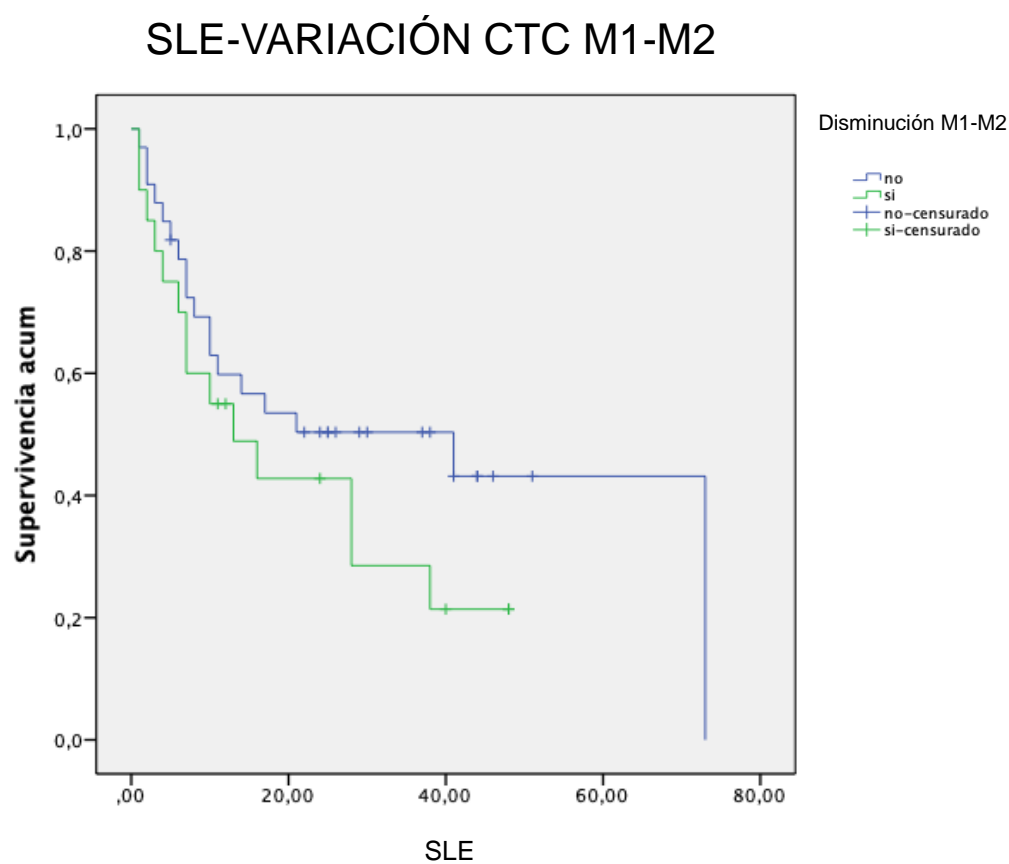


Figura 19. SLE según variaciones entre M1 y M2

## Resultados por grupos

### ESTADIOS AVANZADOS

Se extrajeron 25 M1 y 25 M2, correspondientes a los 25 pacientes incluidos en este grupo.

En la tabla 16 se observa la distribución de las CTCs aisladas en el grupo de pacientes en estadios avanzados.

Nº Paciente	Nº CTC M1	Nº CTC M2
1	5	1
2	0	1
3	25	6
4	25	2
5	0	1
6	3	0
7	4	1
8	0	3
9	0	0
10	15	9
11	1	1
12	4	0
13	3	1
14	0	0
15	1	0
16	0	0
17	0	0
18	37	12
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	1	0
23	0	1
24	0	1
25	8	1

Tabla 16. Distribución CTCs en pacientes en estadios avanzados.

En los pacientes en estadio IIIB/IV la mediana de CTCs aisladas en la muestra pretratamiento fue de 1, presentando un rango de 0 a 5. En el caso de la segunda muestra, la mediana calculada es de 1 con un rango de 0 a 1. No se observaron diferencias significativas entre la distribución de las variables sociodemográficas y la presencia de CTCs en la muestra pretratamiento.

No se halló diferencia entre el aislamiento de CTCs en la M1 y las variables tumorales cT, cN e histología.

La variación en el número de CTCs entre las 2 muestras extraídas no presentó diferencias en relación a las variables recabadas comentadas previamente.

En este grupo de pacientes, se objetivaron modificaciones en el número de CTCs en 17 pacientes. Doce de ellos presentaron un descenso en el número de CTCs entre la M1 y la M2. En 5 pacientes se registró un aumento en el conteo de CTCs. En los 8 pacientes restantes, no hubo variación en la cifra de CTCs.

Las curvas de SG en relación a la presencia o ausencia de CTCs en la M1 de pacientes con tratamiento quimioterápico no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,978$ ). La mediana de SG fue de 6 meses en los pacientes con CTCs en esta muestra vs 11 meses en los que no se detectaron células (figura 20).

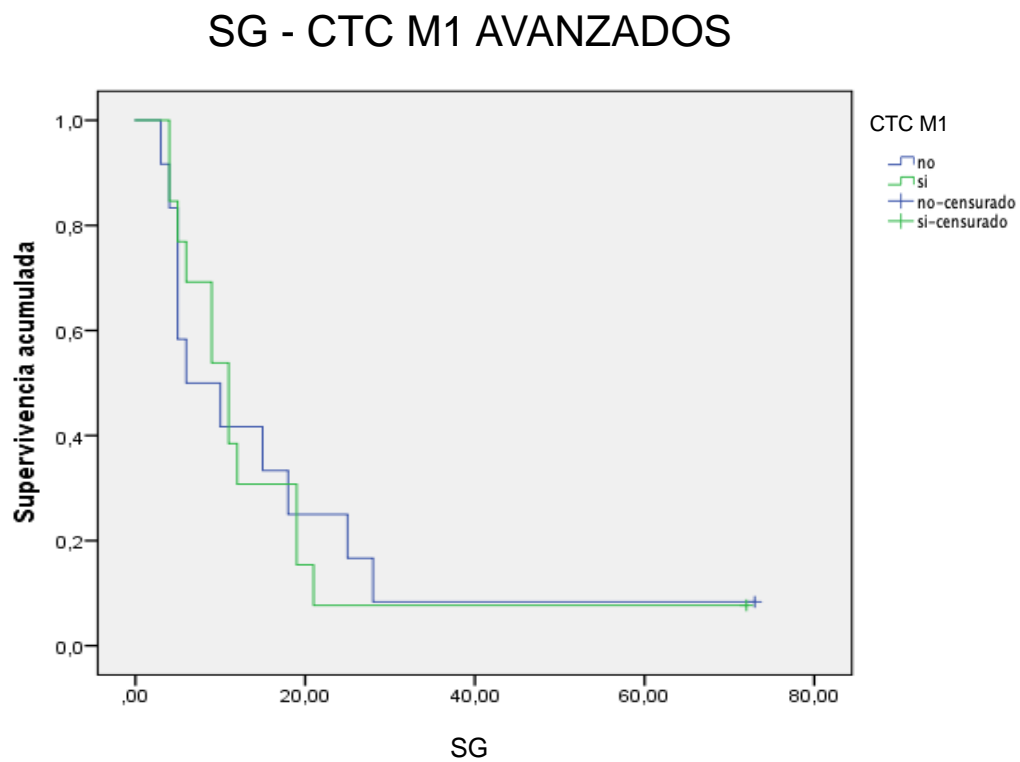


Figura 20. SG según presencia de CTCs en M1.

Los pacientes con CTCs en M1 presentaron una mediana de SLP de 6 meses. Los pacientes sin CTCs en M1 presentaron una mediana de SLP de 7 meses. No se halló diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p=0,486$ ) (figura 21).

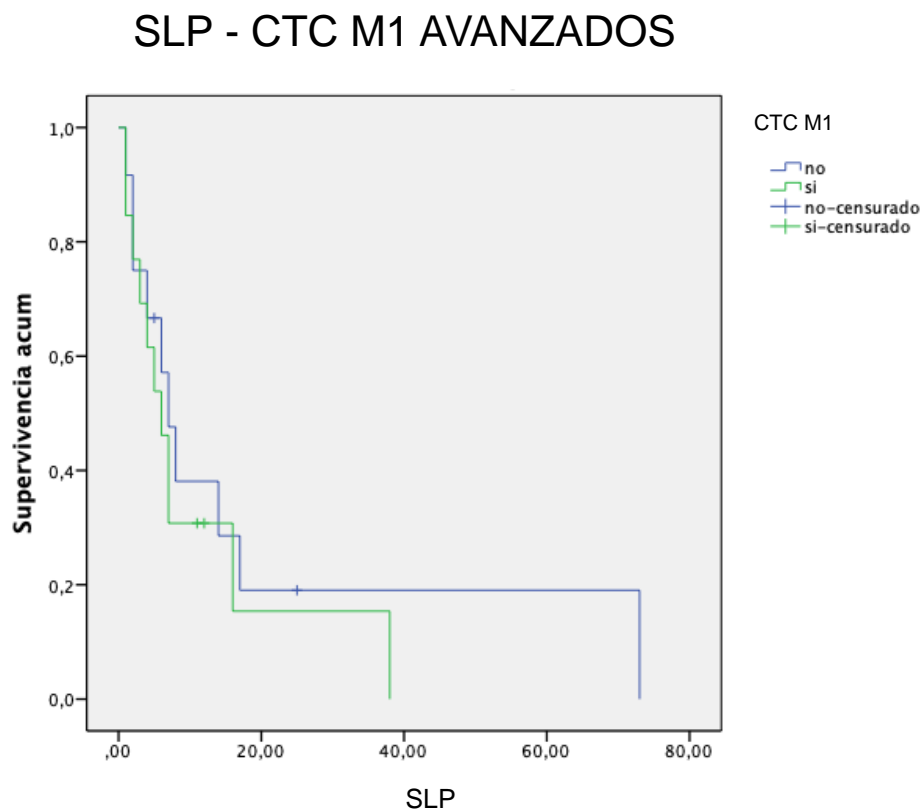


Figura 21. SLP según presencia de CTCs en M1.



La mediana de SG en pacientes en los que se no aislaron CTCs en su M2 fue de 19 meses, superior a la de aquellos pacientes que mostraron persistencia de éstas, cuya mediana de SG fue de 5 meses. Las curvas de supervivencia mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,006$ ) (figura 22).

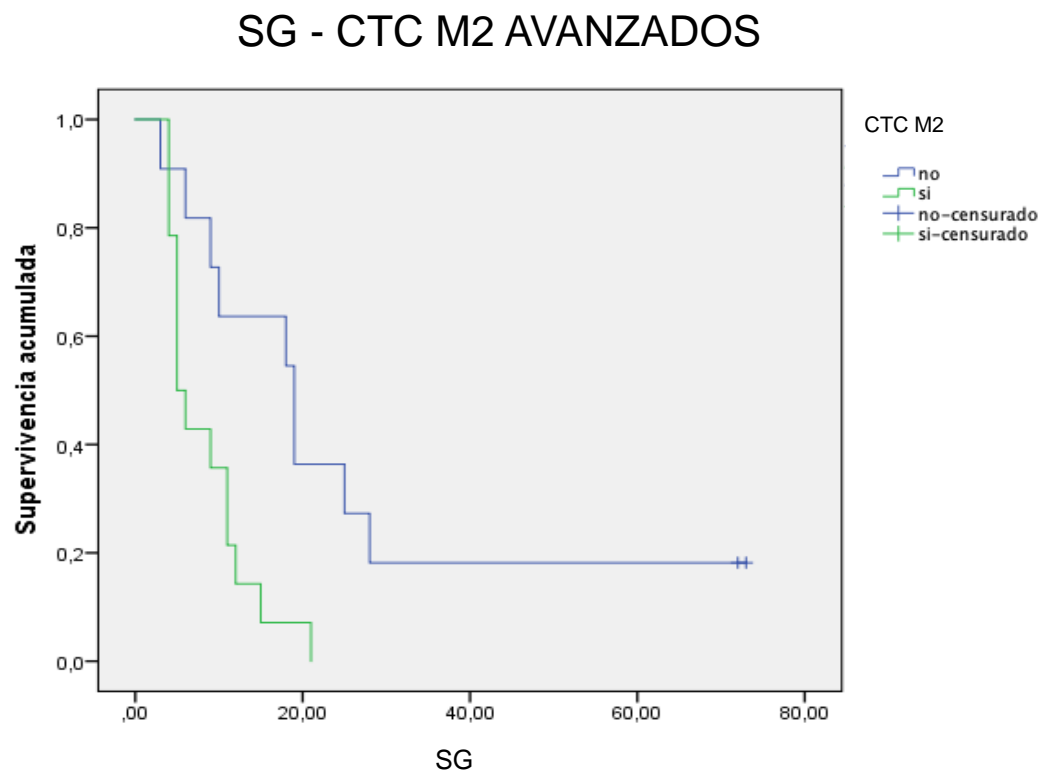


Figura 22. SG según presencia de CTCs en M2.

Los pacientes con presencia de CTCs en la M2 mostraron una peor mediana de SLP, 4 meses, que los pacientes en los que no se detectaron CTCs, 8 meses. Aun así no se encontraron diferencias entre las curvas de SLP ( $p=0,123$ ) (figura 23).

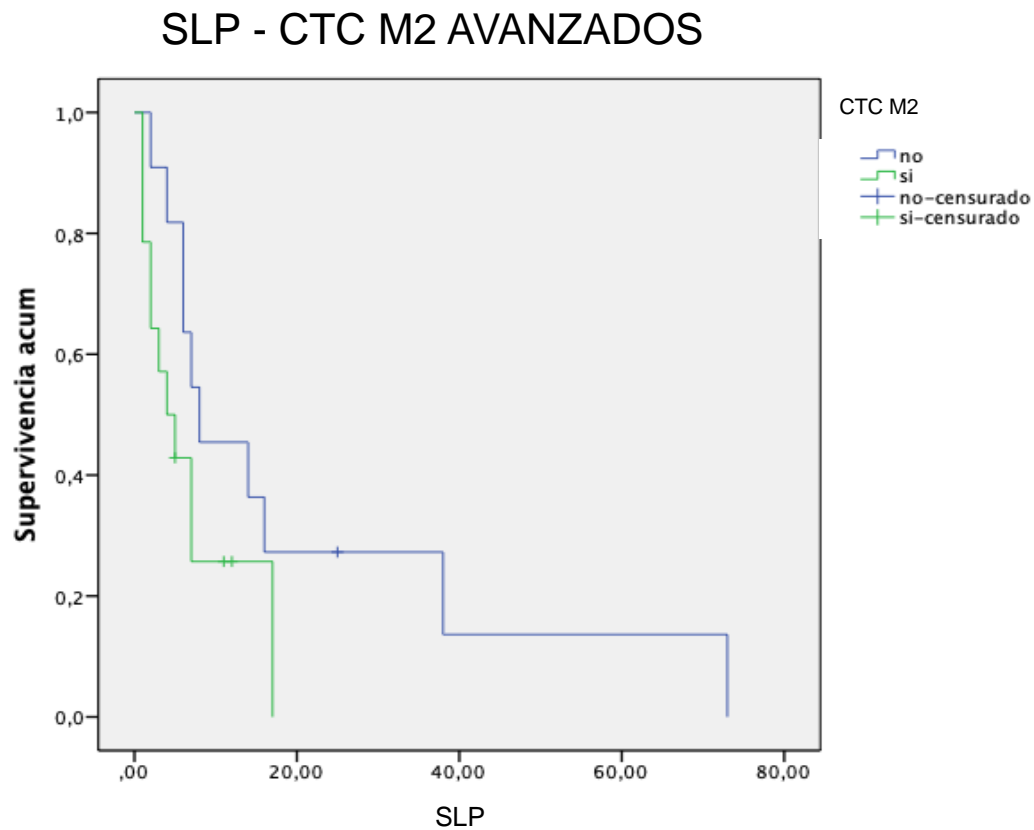


Figura 23. SLP según presencia de CTCs en M2.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de SG de los pacientes en los que se observó un descenso en el recuento de CTCs entre la M2 y la M1 ( $p=0,854$ ). Se determinó una mediana de SG de 6 meses en pacientes sin disminución en el número de CTCs, y una mediana de 11 meses en los que sí se produjo un detrimento (figura 24).

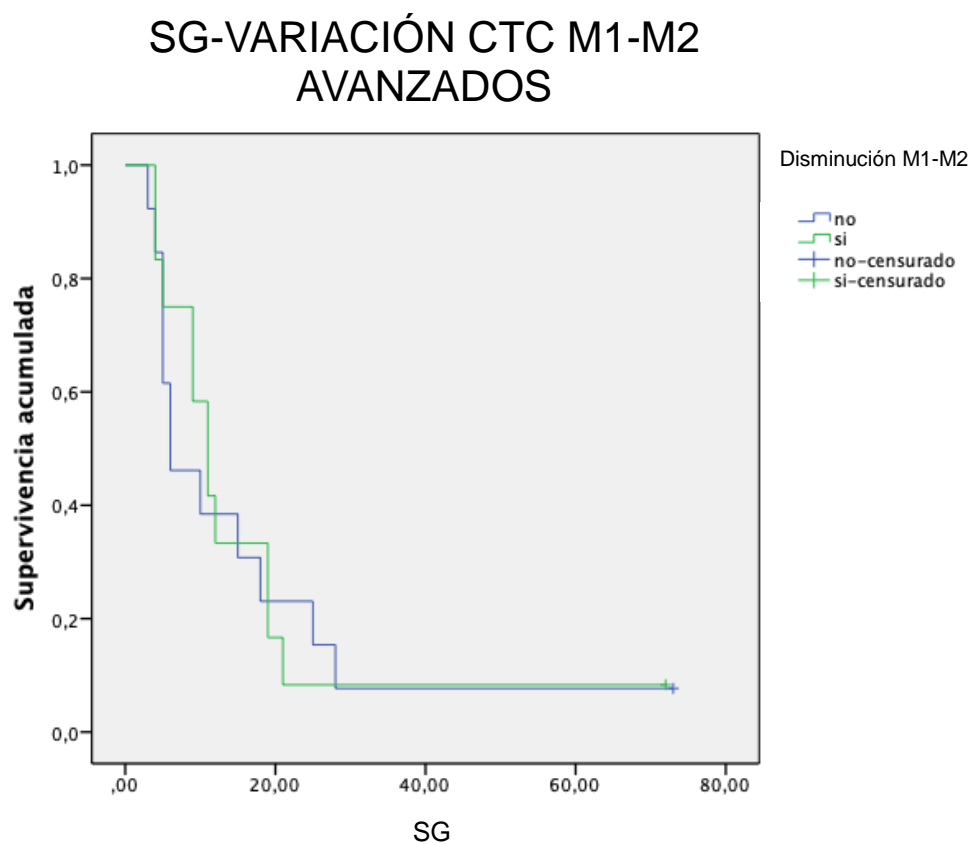


Figura 24. SG según variaciones entre M1 y M2.

Las curvas de SLP no variaban de forma significativa en función del descenso en la detección de CTCs entre las dos muestras extraídas ( $p=0,649$ ) (figura 25).

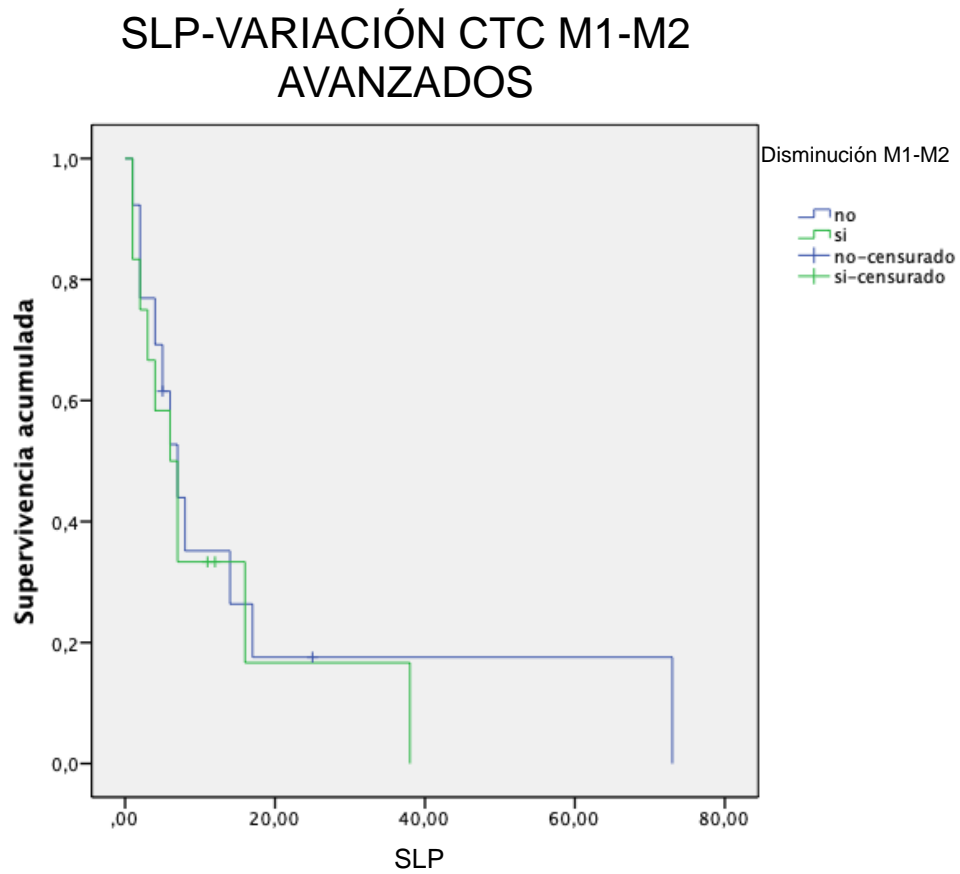


Figura 25. SLP según variaciones entre M1 y M2.

## ESTADIOS PRECOCES

La distribución de las CTCs en los pacientes en estadios iniciales se recoge en la tabla 17.

Nº Paciente	Nº CTC M1	Nº CTC M2	Nº CTC M3	Nº CTC MR
1	0	1	0	
2	1	0	1	
3	7	0	2	0
4	1	0	0	
5	0	0	4	
6	1	0	0	
7	0			0
8	0	0	0	
9	0	0	0	
10	0	0	0	
11	8	1	0	
12	0	1	2	
13	2			0
14	0	10	3	
15	0			0
16	0			0
17	0	0	2	
18	0	0	0	
19	0			0
20	0	3	0	
21	0			4
22	0	0		2
23	0	0	0	
24	8	0	1	
25	3			2
26	1	9	11	
27	0	0	0	
28	0	1	0	

Tabla 17. Distribución CTCs en pacientes en estadios precoces.

En el grupo de los pacientes en estadios desde I a IIIA, el aislamiento de CTC fue el siguiente:

- En las 28 primeras muestras recogidas, la mediana de CTC halladas fue de 0 con un rango de 0 a 1.
- Las segundas muestras extraídas fueron 21. Las CTCs aisladas en este caso presentaron una mediana de 0 con igual rango a las M1.
- 20 fueron las muestras extraídas a los dos años de la cirugía, correspondiente a la tercera muestra, con una mediana de CTC aisladas de 0, siendo el rango en este caso de 0 a 2.
- Las muestras de recidiva se realizaron en 9 pacientes. La mediana calculada en este grupo fue de 0 y con un rango de 0 a 2.

En el análisis realizado para determinar una diferencia en la distribución entre la presencia de CTCs en la muestra previa a la cirugía y las variables sociodemográficas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se advirtieron diferencias en lo que se refiere a la disminución de CTCs entre M1 y M2 y estas variables.

No se observaron diferencias significativas entre la distribución de las variables tumorales cT, cN, pT, pN, histología, grado de diferenciación y el número de ganglios afectos N1 y N2 y la detección de CTCs en la M1.

La modificación en el número de CTCs entre las muestras no presentó diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las variables previamente mencionadas.

El descenso de CTCs entre M1 y M2 sólo se observó en 6 pacientes. Otros 6 de los 28 presentaron aumento en el recuento de CTCs, hallándose

heterogeneidad en características tumorales y/o quirúrgicas de estos pacientes. No hubo variación en el número de células en 9 pacientes.

Los 7 pacientes restantes presentaron recidiva por lo que se extrajo MR. En estos pacientes y comparando MR con M1, 4 pacientes no sufrieron modificaciones en su número de CTCs, en dos de ellos se observó un descenso y uno de ellos presentó un aumento.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con CTCs aisladas en su M1 en relación a las curvas de SG ( $p=0,879$ ). En ninguno de los dos grupos se alcanzó la mediana de SG. En el grupo en el que no se detectaron CTCs en la M1, a los 42 meses la SG era del 67,1%. En el grupo con CTCs, a los 31 meses la SG era del 74,1% (figura 26).

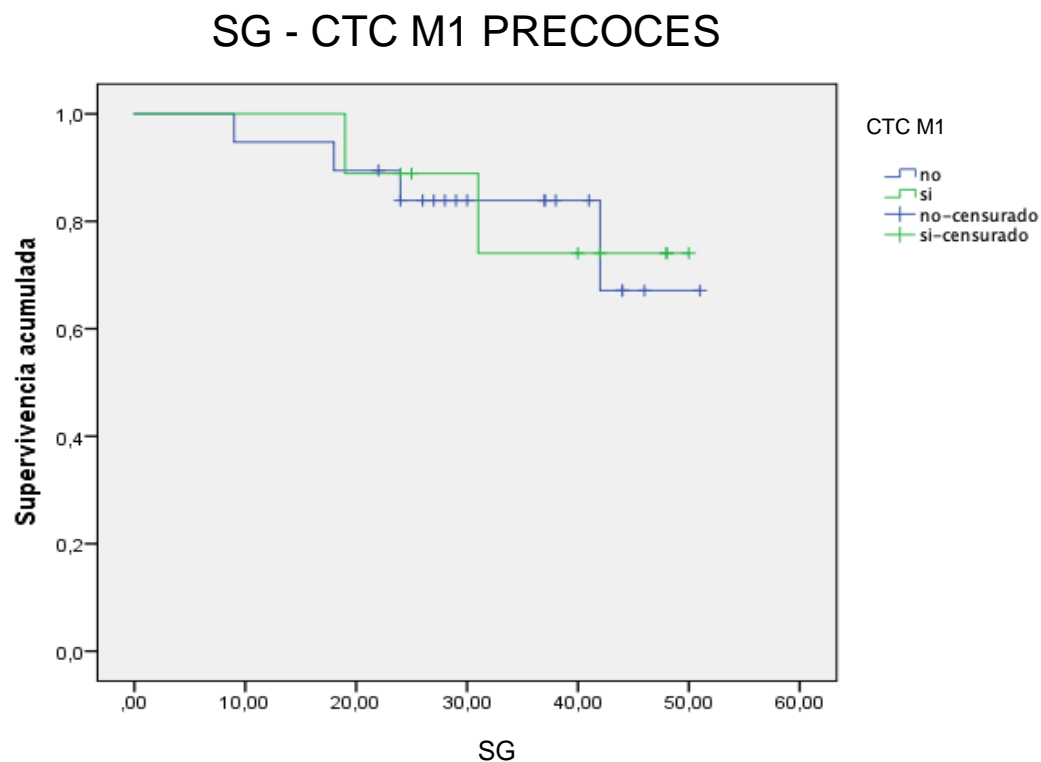


Figura 26. SG según presencia de CTCs en M1.

En los pacientes en los que se aislaron de CTCs en M1 no presentaron una peor curva de SLE,  $p=0,822$ . La mediana de SLE de los pacientes en los que se aislaron CTCs en su M1 fue de 28 meses. En cambio, de los pacientes sin detección de células, a los 41 meses, el 57% no presentaba recidiva de la enfermedad (figura 27).

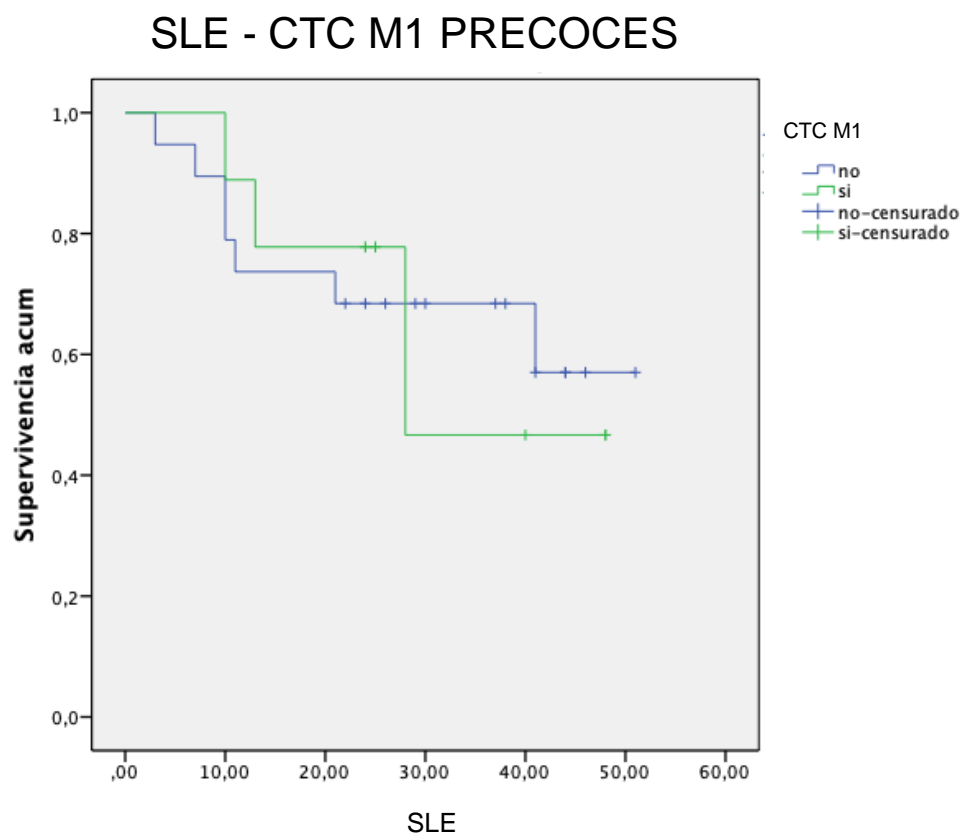


Figura 27. SLE según presencia de CTCs en M1.



En ninguno de los dos grupos se alcanzó la mediana de SG. En el grupo en el que no se detectaron CTCs en la M2, a los 42 meses la SG era del 76,2%. En el grupo en los que sí se aislaron CTCs, todos los pacientes permanecían vivos a los 41 meses de seguimiento. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,446$ ) (figura 28).

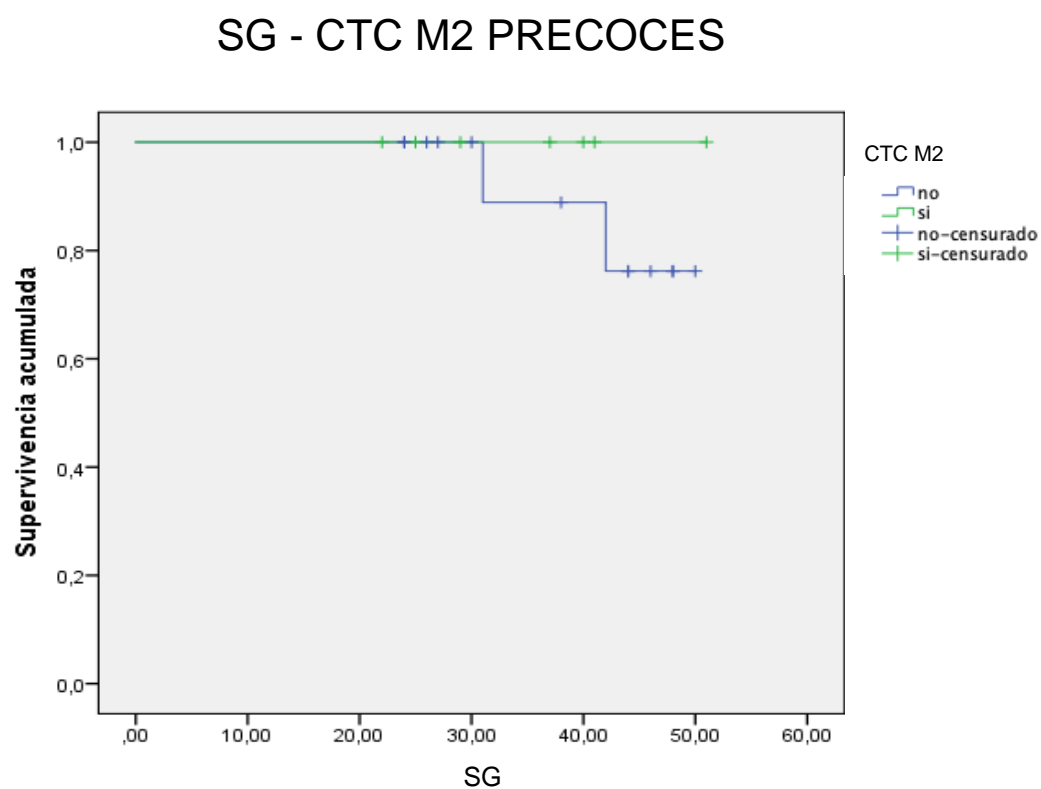


Figura 28. SG según presencia de CTCs en M2.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la curva de SLE entre los pacientes con CTCs en M2 y los que no presentaron células tumorales ( $p=0,168$ ) (figura 29).

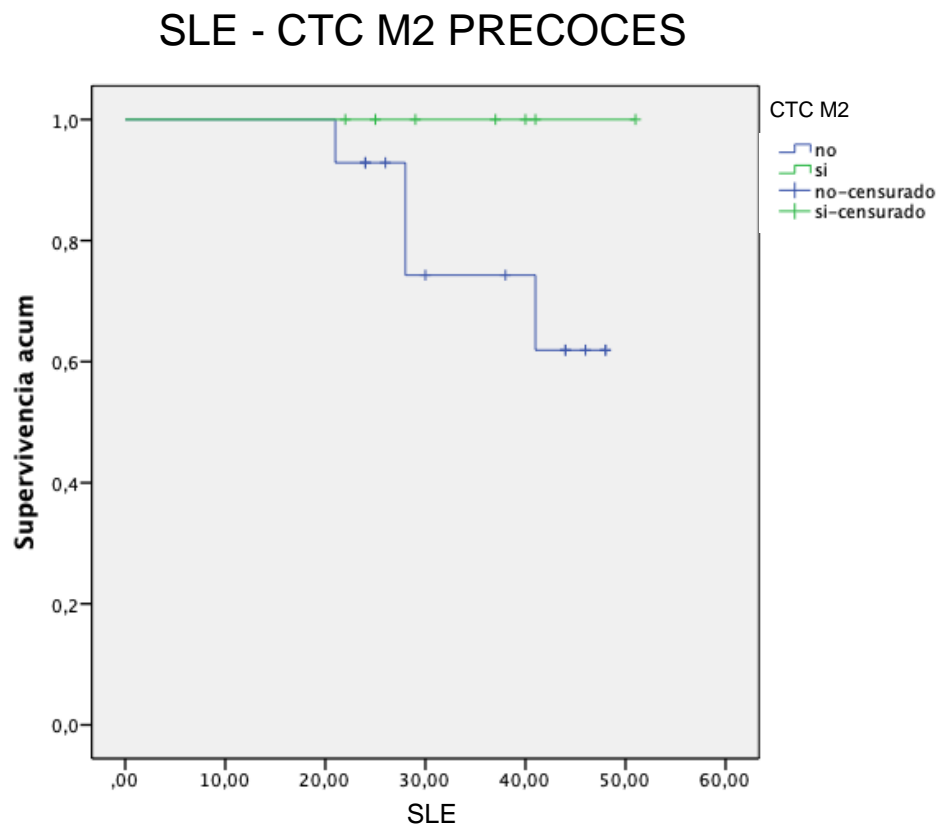


Figura 29. SLE según presencia de CTCs en M2.

El aislamiento de CTCs en M3 no determinó una peor curva de SG que en su ausencia, con  $p=0,229$ . A los 48 meses de seguimiento los 7 pacientes con CTCs en su M3 continuaban vivos. El 68,6% de los pacientes en los que no se aislaron CTCs seguían vivos a los 42 meses de seguimiento (figura 30).

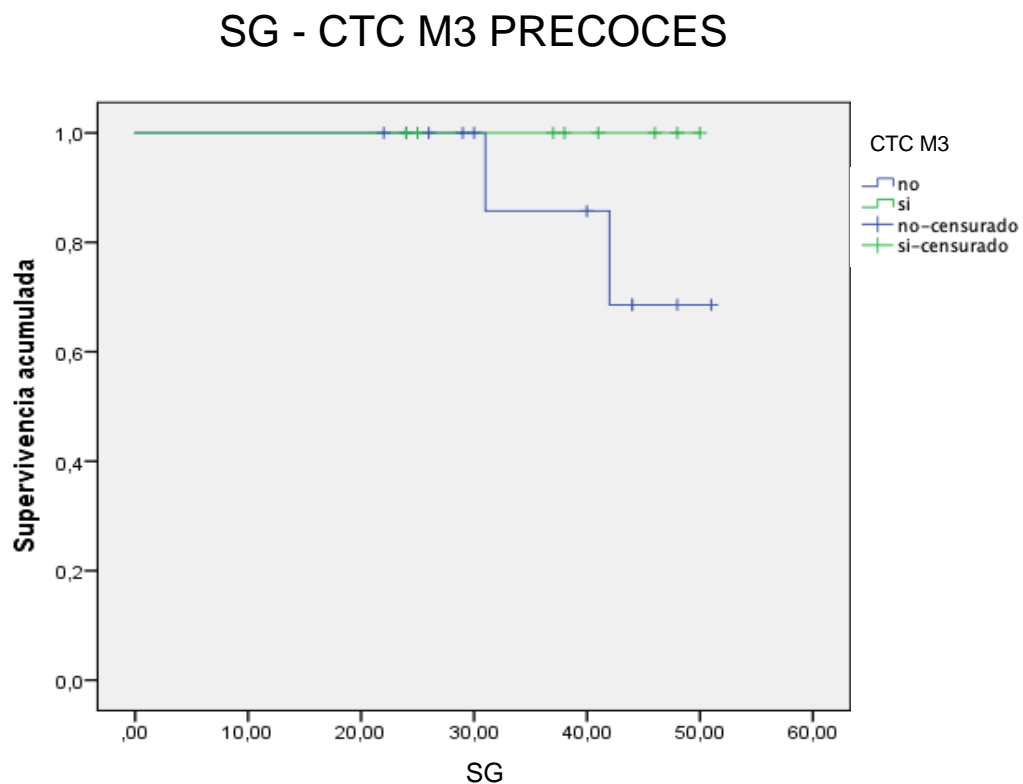


Figura 30. SG según presencia de CTCs en M3.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de SLE de los grupos con y sin aislamiento de CTCs en M3 ( $p=0,832$ ) (figura 31).

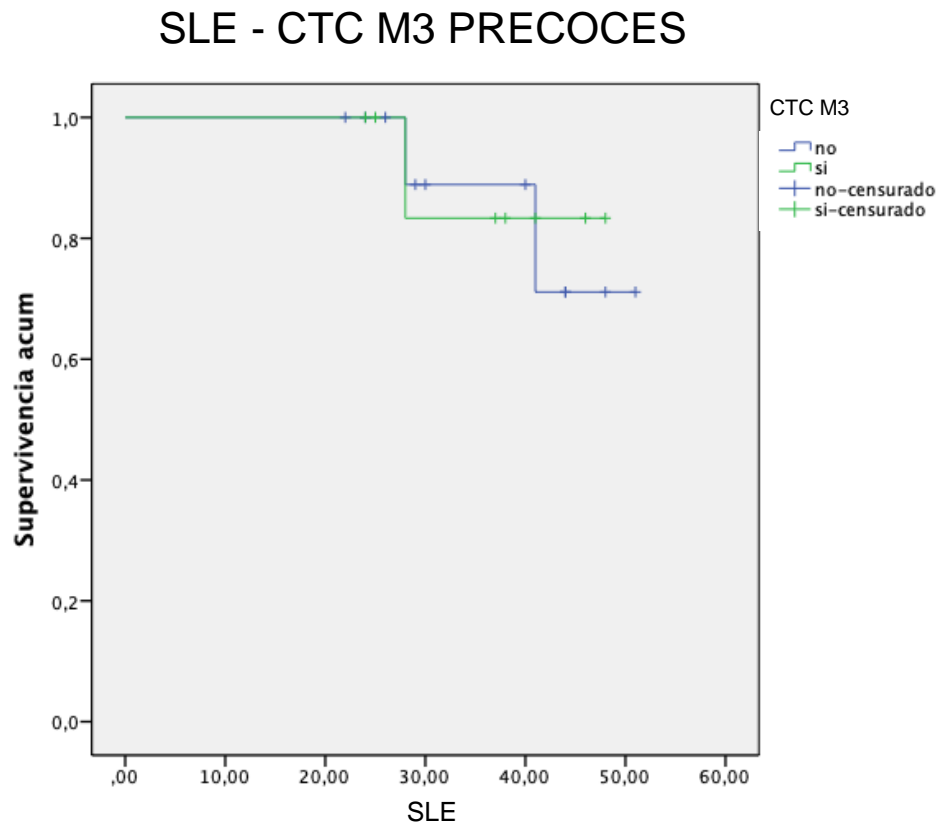


Figura 31. SLE según presencia de CTCs en M3.

Los pacientes que presentaron recidiva de su enfermedad y presencia de CTCs en MR mostraron una mediana de SG de 23 meses. En el grupo de los pacientes sin CTCs no se alcanzó la mediana de SG, estando vivos el 66,7% a los 18 meses de seguimiento. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las curvas de SG ( $p=0,581$ ) (figura 32).

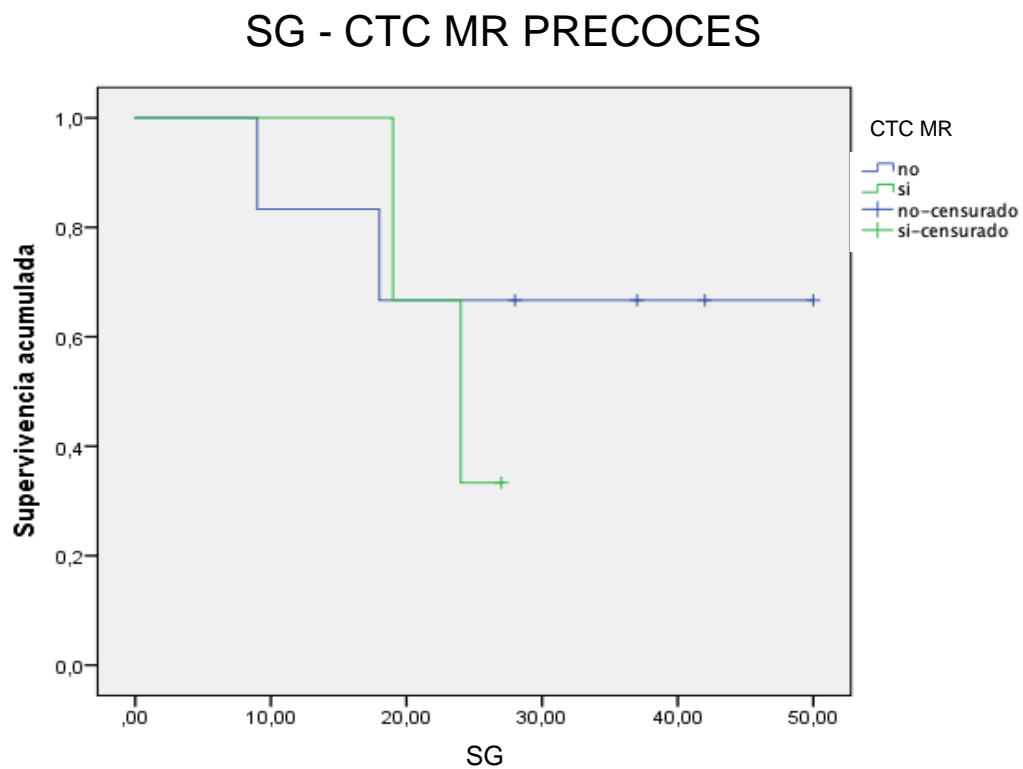


Figura 32. SG según presencia de CTCs en MR.

Los pacientes a los que se extrajo MR presentaron una mediana de SLE de 10 meses, tanto en el grupo en el que se aislaron CTCs como en aquellos en los que no (figura 33).

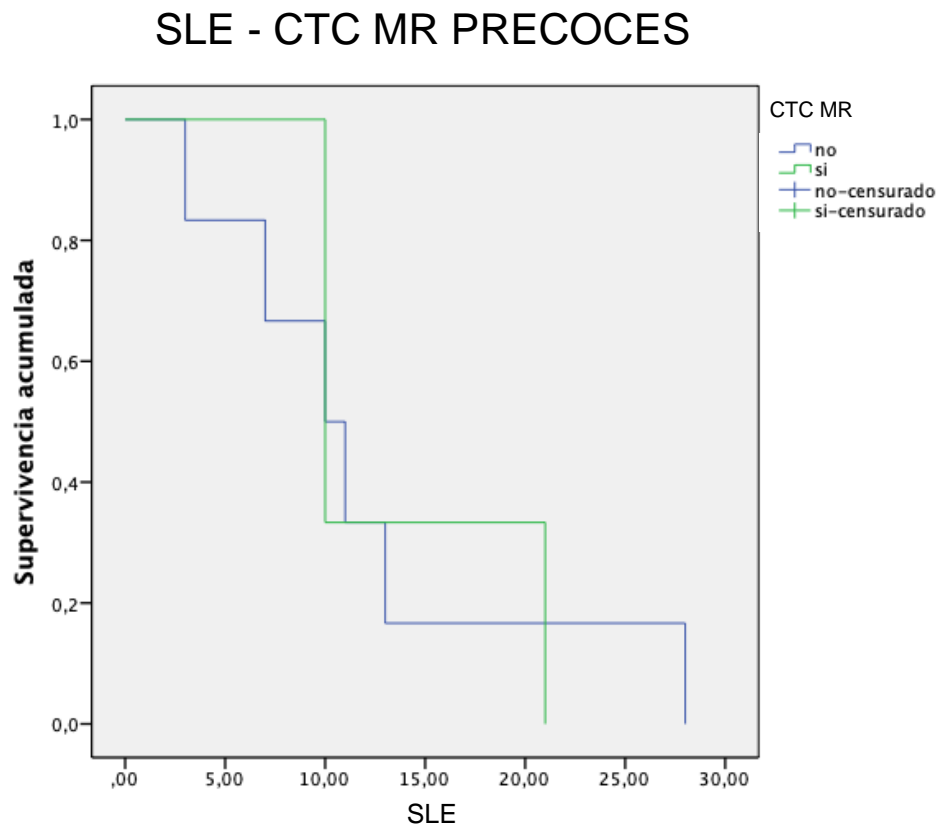


Figura 33. SLE según presencia de CTCs en MR.

No se observaron diferencias estadísticamente significativa en las curvas de SG entre los pacientes que presentaron variaciones en el número de CTCs entre la primera muestra extraída y la segunda, correspondiendo ésta tanto a la M2 como a la MR (cuando la recidiva ocurrió antes de la extracción de M2 durante el primer año de seguimiento) ( $p=0,982$ ) (figura 34).

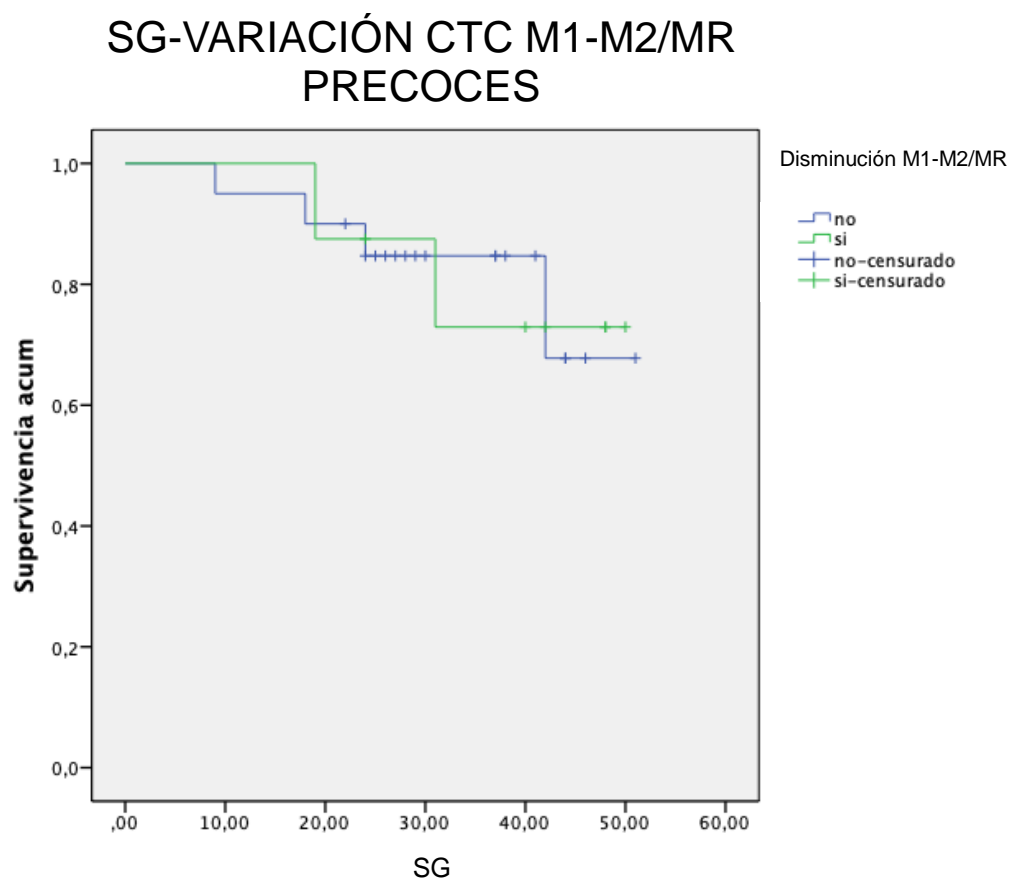


Figura 34. SG según variaciones entre M1 y M2/MR.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que presentaron disminución del número de CTCs en M2/MR y la M1 respecto a la mediana de SLE ( $p=0,654$ ). La mediana en el grupo de los pacientes con variación de CTCs es de 28 meses, mientras que en el grupo de los que no se observó modificación, no se alcanzó la mediana y a los 41 meses el 58,3% de los pacientes no habían recidivado (figura 35).

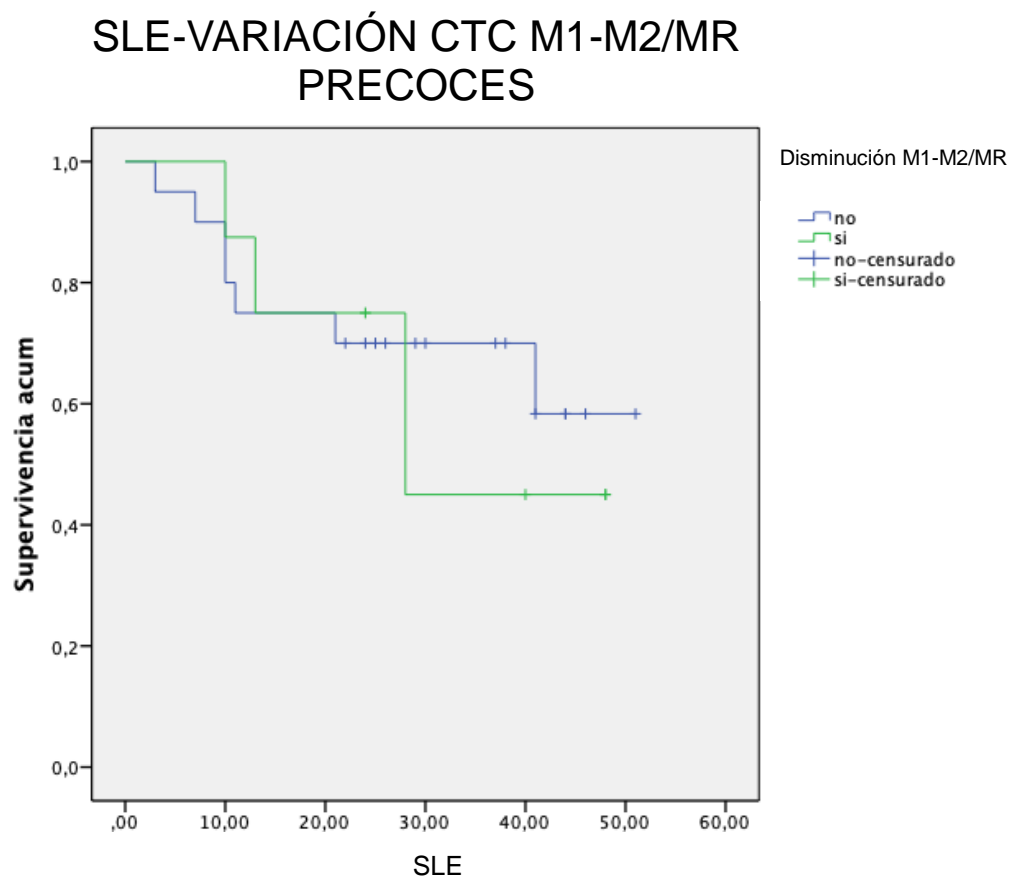


Figura 35. SLE según variaciones entre M1 y M2/MR.



Si el cálculo se realiza exclusivamente con la diferencia entre M2 y M1, tampoco se hallan diferencias estadísticamente significativas en las curvas de SG ( $p=0,726$ ) (figura 36).

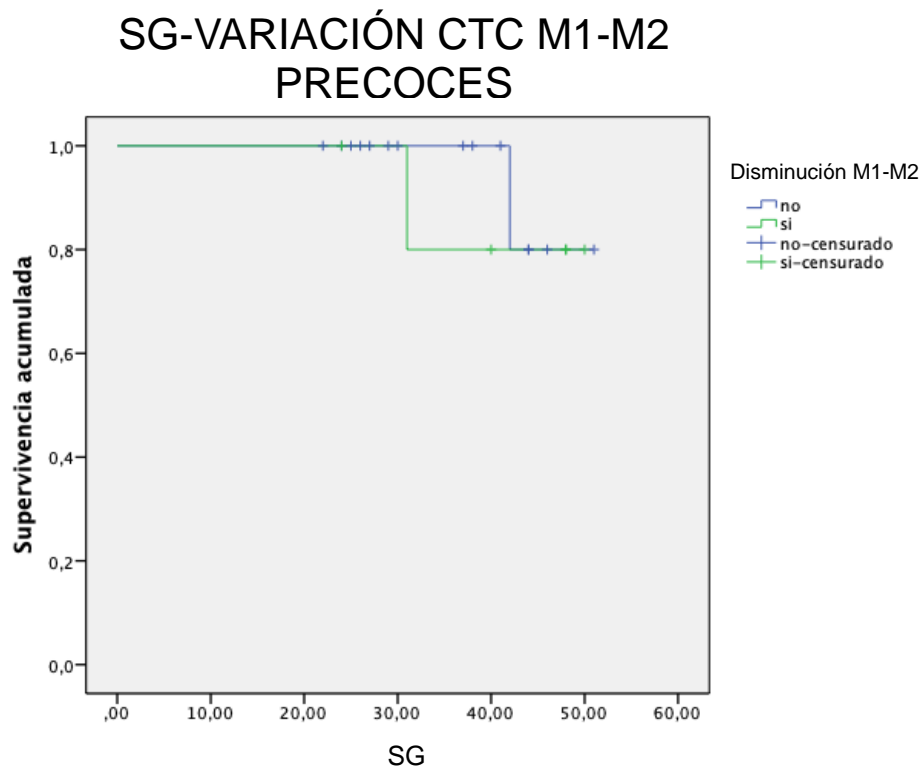


Figura 36. SG según variaciones entre M1 y M2.

En el análisis de SLE respecto a estas muestras, tampoco se objetivaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,374$ ) (figura 37).

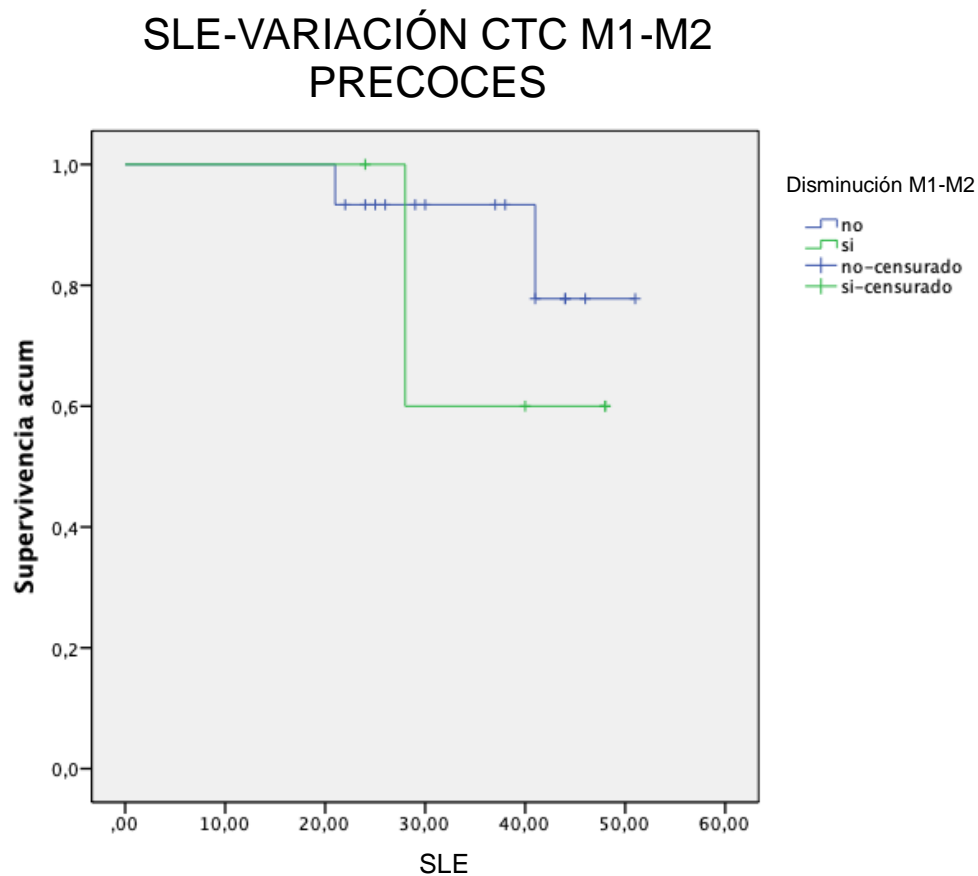


Figura 37. SLE según variaciones entre M1 y M2.

En la comparación M3-M1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,485$ ) (figura 38).

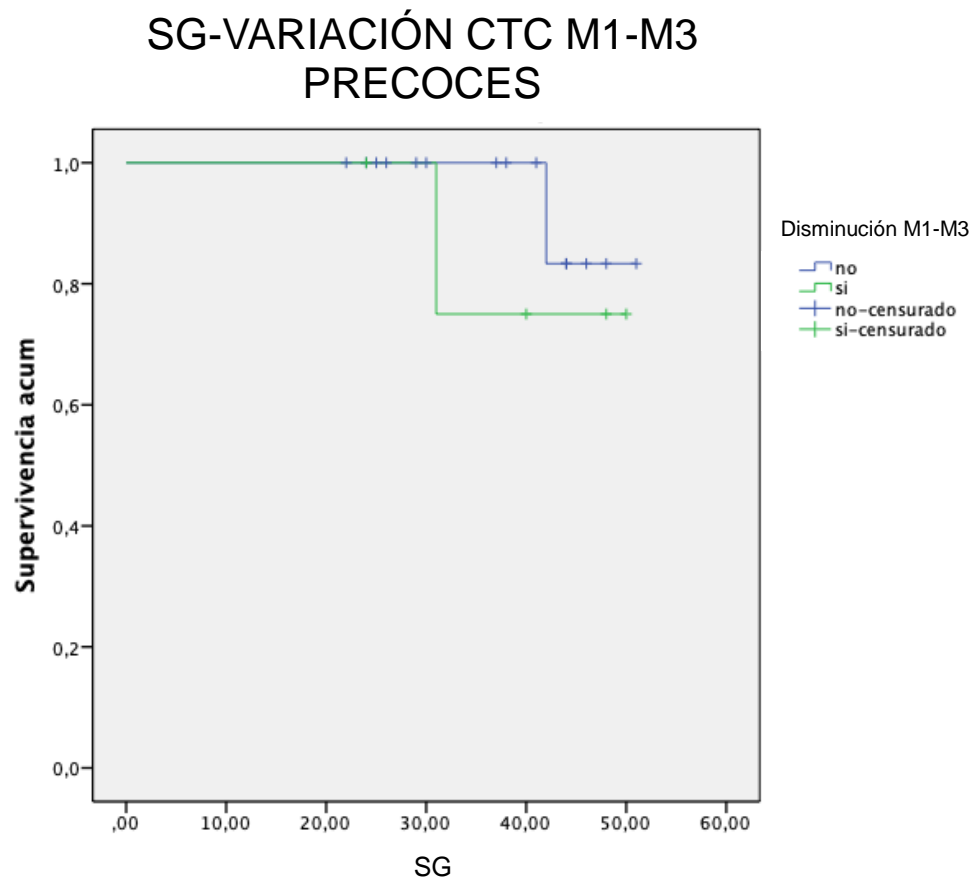


Figura 38. SG según variaciones entre M1 y M3.

En el grupo de los pacientes con disminución de CTCs entre la M3 y la M1, la mediana de SLE fue de 28 meses. En cambio, en el grupo de los que no disminuyó no alcanzó la mediana de SLE y a los 41 meses el 85,7% de los pacientes no habían tenido recidiva (figura 39). A pesar de esta diferencia, no se alcanzó la significación estadística ( $p=0,051$ ).

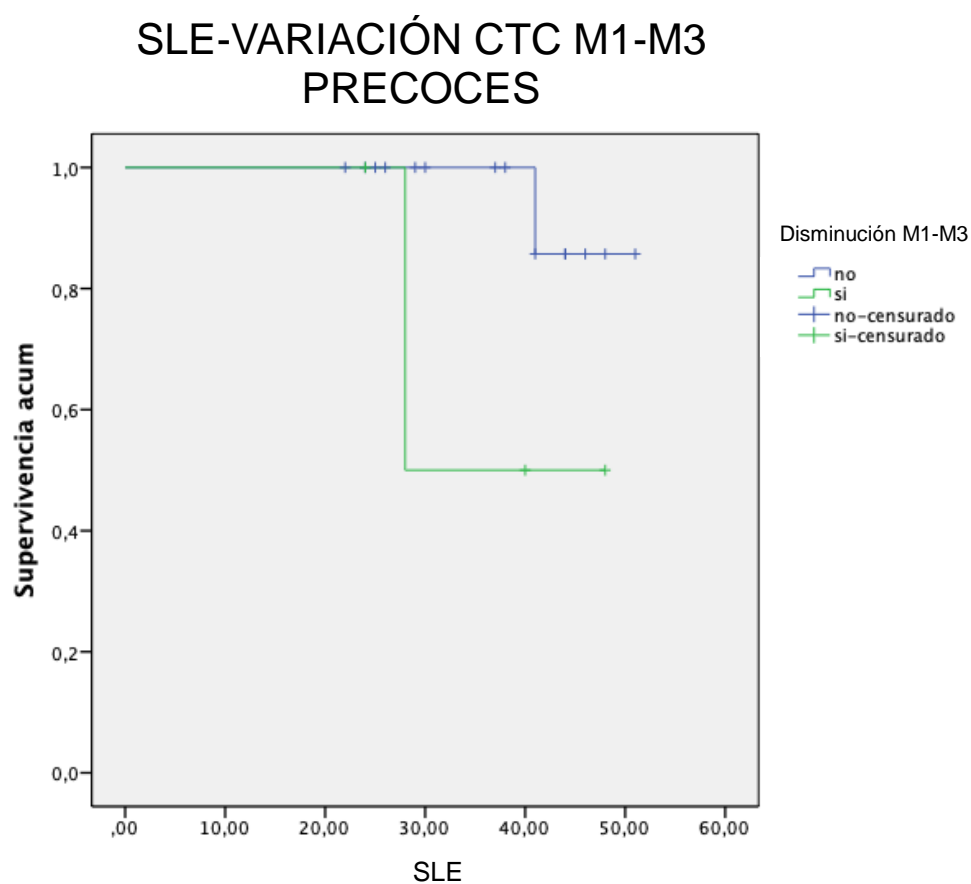


Figura 39. SLE según variaciones entre M1 y M3.

No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con variación entre la M2 y M3 en relación a la curva de SG ( $p=0,507$ ) (figura 40).

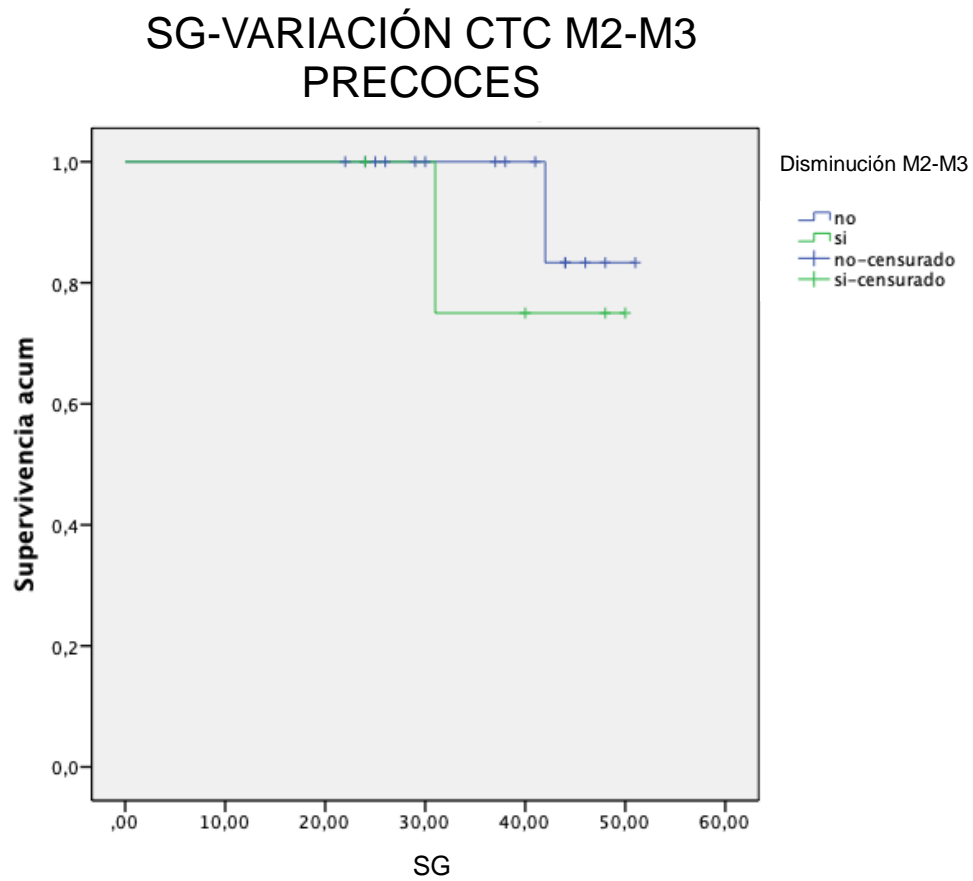


Figura 40. SG según variaciones entre M2 y M3.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la curva de SLE y la modificación en el número de CTCs entre M2 y M3 ( $p=0,338$ ).

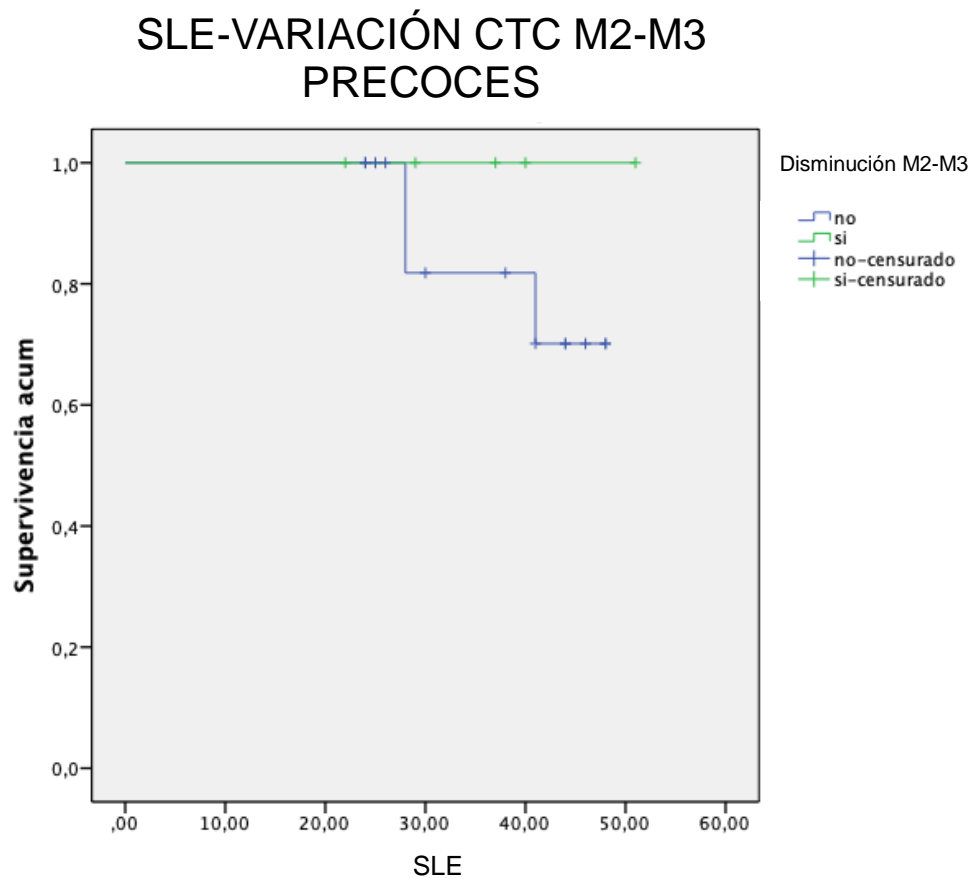


Figura 41. SLE según variaciones entre M2 y M3.

## ***DISCUSIÓN***

## *DISCUSIÓN*

El momento del diagnóstico del CPNCP es de vital importancia porque marcará el pronóstico del paciente. Aún así, hay pacientes que con el mismo estadio y con las mismas características, tanto demográficas como tumorales y de tratamiento, presentarán una evolución de la enfermedad completamente diferente. Ante esto debemos pensar que hay ciertos factores en relación al CPNCP que no conocemos y que convendría evaluar para mejorar el pronóstico de esta patología.

La presencia de CTCs en el CPNCP ha demostrado de forma variable su influencia en el pronóstico tanto de los pacientes en estadios iniciales como avanzados.

### **Descripción de grupo**

Las características sociodemográficas de nuestro grupo de pacientes son similares a la registrada en la bibliografía previa, mostrando el importante cambio epidemiológico en relación a la distribución por sexos. Está compuesto principalmente por varones (72%), aunque con un número no desdeñable de mujeres (15/53), lo que puede considerarse reflejo de la epidemiología global actual del CPNCP (95).

Como ya se ha comentado, el principal factor relacionado con la aparición de CPNCP es el tabaco. A pesar del cese del hábito tabáquico, el riesgo de padecer cáncer de pulmón tanto en los fumadores como en los exfumadores es superior a aquellos que no han fumado nunca. En nuestro estudio 48 pacientes se englobaban dentro de este grupo, y solo cinco no habían sido nunca fumadores. Esta distribución se mantenía tanto en los pacientes



operados como en los que no, estando el mayor número de pacientes en el sector de “exfumador de más de dos años” en ambos grupos. Fijándonos en esta distribución y viendo que es similar a la distribución “global” parece mandatorio no solo intensificar los esfuerzos en la rama del diagnóstico precoz, sino también en la prevención del inicio del hábito tabáquico (96) (97).

La mediana de edad fue de 67 años, tanto en los estadios precoces como avanzados, mostrando similitud con series previas.

La distribución clásica según el tipo histológico marcaba a la cabeza del CPNCP el carcinoma escamoso, principalmente por su asociación con el tabaco. Con el aumento de los tumores sin relación con el tabaco, el adenocarcinoma se presenta como el tipo más frecuente (98). En nuestra serie global encontramos 39 adenocarcinomas (73,6%) y tan solo 6 epidermoides. Resulta especialmente llamativo que en el grupo de estadios avanzados no se reclutaron enfermos con esta histología.

Como ya se ha reseñado previamente, dividimos al total de nuestros pacientes en dos grupos según su estadio (precoz/avanzado) y según éste, fueron tratados de acuerdo a las guías según la estadificación clínica.

Los pacientes en estadios precoces fueron sometidos a cirugía con intención curativa seguidos o no de tratamiento adyuvante.

La cirugía que principalmente se realizó fue la lobectomía (75%) con linfadenectomía sistemática de mediastino (82%). La realización de segmentectomía, solo recomendada en pacientes con tumores de menos de dos cm y sin afectación ganglionar, fue llevada a cabo en tres pacientes. Aunque ya en el 2005 se señaló que podría no haber diferencias entre la

lobectomía y la resección segmentaria (20), el auge principal de este tipo de cirugía probablemente sea posterior al reclutamiento de nuestro colectivo.

Una de las características especiales de nuestra muestra es la ausencia de pacientes que hayan requerido una neumonectomía. A pesar de que las causas para tal hecho no han sido estudiadas de forma específica, podemos teorizar que se trata de un sesgo de selección de la muestra justificado por dos motivos principales; el primero es que resultaría fácil que este tipo de pacientes hubiera incurrido en alguno de los múltiples criterios de exclusión del estudio, o simplemente en que la resección pulmonar necesaria para conseguir la R0 no precisara la realización de una neumonectomía.

Respecto al grupo de pacientes avanzados, 23 de ellos fueron incluidos en el estadio IV, estadio más frecuente al diagnóstico y cuya base de tratamiento es la quimioterapia. El esquema seguido por nuestros enfermos consistió en una pauta doble basada en platino con antiangiogénicos o en platinos con antifolato, según los estándares determinados en ese momento. Este esquema sigue las recomendaciones de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la American Society of Clinical Oncology (ASCO), con la combinación de platinos, antifolatos y/o antiangiogénicos en histologías no escamosas y pautas de platino en los escamosos. Aquellos pacientes cuyo estado general lo permita, deben ser tratados con la doble terapia con platino, (con mejores resultados si es utilizado el cisplatino en vez de el carboplatino) más paclitaxel, gemcitabina, docetaxel, vinorelbina o pemetrexed, ya que ha demostrado superioridad frente a la monoterapia. El tratamiento final entre las posibles combinaciones deberá elegirse según cada caso, tanto por las características del paciente como por las anatomopatológicas del tumor (99).

Los dos pacientes restantes se diagnosticaron en estadio IIIB, cuyo tratamiento recomendado es la quimio-radioterapia, protocolo que solo cumplió uno de los pacientes.

### **Metodología de la extracción de muestras sanguíneas**

Aunque la detección de CTCs es un proceso conocido desde hace tiempo, como ya se comentó previamente, ha sido con el desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímica cuando ha comenzado su verdadera andadura. Debido a que esta andadura es relativamente reciente, no hay un protocolo “internacional” en el que se establezca cómo, cuándo y de dónde hay que realizar la extracción sanguínea.

En relación al “cómo”, debido a que nuestro dispositivo utiliza marcadores epiteliales para detectar las CTCs, se decidió desechar los primeros ml de sangre extraída para disminuir las posibilidades de contaminación (100).

El momento de la extracción se realizó de forma ajustada a las características y los tratamientos recibidos en cada grupo.

En el caso de los pacientes en estadios avanzados, la muestra recogida fue de sangre periférica. La primera muestra se extrajo previo al inicio del tratamiento para así poder valorar la presencia basal de CTCs y las posibles modificaciones posteriores y su posible influencia en el pronóstico. De igual manera, la segunda muestra, obtenida tras el primer ciclo de QT, fue utilizada para ver las modificaciones que había sufrido el número CTCs y cómo la QT había influido en él, y determinar si estas variaciones influían en el desarrollo de la enfermedad.

El calendario de extracción de muestras podemos decir que es una decisión de cada grupo investigador, y por tanto arbitrario, puesto que no existe conocimiento preciso del comportamiento de las CTCs en el tiempo ni cuando sometemos a los pacientes a las distintas terapias. Un aspecto que suele ser constante es la toma de una determinación pre-tratamiento que permita monitorizar desde entonces los posibles cambios que acontezcan. Sin embargo nuestro grupo no ha sido el primero en escoger este esquema, ya lo hizo en su momento también el grupo de Krebs y colaboradores (68). Algunas otras alternativas publicadas son la extracción de la segunda muestra tras dos ciclos de QT como Juan et al (69), o alternativas muy distintas como la descrita por el grupo de Nieva en el que se obtuvieron muestras a las 3 semanas y a los 3, 6, 9 y 12 meses (101).

Similar escenario ocurre en los pacientes en estadios iniciales. En este grupo decidimos efectuar un seguimiento de mayor duración (dos años) porque habitualmente su supervivencia es mayor que en estadios avanzados y principalmente porque es en estos dos primeros años cuando ocurren el mayor número de recidivas.

Del mismo modo que en el otro grupo, la extracción de todas las muestras se realizó de un acceso periférico, lo que ya supone una diferencia con varios artículos. El grupo japonés de Okumura decidió realizar una extracción de sangre periférica y otra de sangre de vena pulmonar previo al inicio de la cirugía (102). Hay grupos incluso que decidieron realizar la extracción de vena pulmonar, pero una vez realizada la resección pulmonar (103). Crosbie et al siguieron un protocolo similar al grupo de Okumura (104). Ambos detectaron un mayor número de CTCs en sangre de vena pulmonar que en

sangre periférica. Si determinamos que las CTCs son liberadas al torrente sanguíneo desde el tumor, en el CPNCP los vasos más cercanos a la lesión son los pulmonares, lo que puede facilitar su detección por una probable mayor concentración de células a este nivel. Pero la relación de la presencia de estas CTCs con el pronóstico fue dispar. Mientras que en el estudio de Crosbie si se observaron una SG y SLE más cortas, los pacientes de Okumura con CTCs no mostraron esta relación por lo que persiste la duda de si un mayor número de CTCs en sangre venosa central, a nivel de venas pulmonares, tiene un peor impacto en el pronóstico de la enfermedad. A pesar del estudio de Okumura, otros artículos comparten los resultados de Crosbie, como el de Murlidhar (105), volviendo a exponer que la detección de las células es más frecuente, en mayor número y con relación con un peor pronóstico. Este tipo de extracción tiene un problema importante evidente: la mayor complejidad técnica y el mayor riesgo al que se somete a los pacientes para extracción de esta muestra. Una de las premisas para que la biopsia líquida se pueda convertir en una herramienta de rutina en la evaluación de nuestros pacientes es la sencillez técnica y que no suponga riesgos específicos aumentados. El acceso de forma rutinaria al sistema venoso central, venas pulmonares, para extraer muestras en estos pacientes no nos parece un procedimiento viable en la práctica clínica habitual y, por ello, ponemos en duda su utilidad.

Con respecto al “cuándo”, al igual que en el grupo de avanzados, en estadios precoces la primera muestra se obtiene habitualmente previo al inicio de la cirugía. En nuestro caso se extrajo intraquirófano antes de la realización de la incisión. El grupo de Hofman eligió el mismo momento de extracción (75),

aunque para ellos ésta fue muestra única para estudiar la influencia de las CTCs pre-tratamiento en el pronóstico.

En nuestro grupo decidimos extraer la segunda muestra al año de la cirugía para así poder observar las posibles modificaciones en su número y correlacionarlo con el pronóstico. En el caso de Bayarri et al (77), decidieron que su segundo punto de extracción era un mes después de la cirugía, basándose en el artículo de Sawabata donde observaron que a pesar de haber detectado CTCs justo antes y después de la toracotomía, estas células no se aislaban en la muestra extraída 10 días después (106). En cambio, el grupo de Rolle marcó el momento de extracción dos semanas después de la cirugía (107). Resulta obvio que ante tal disparidad puede resultar difícil extraer conclusiones consistentes y es uno de los puntos a mejorar en todo lo que concierne a la investigación en este campo.

En nuestro grupo, la tercera muestra fue extraída a los dos años de la cirugía. El grupo de Rolle también decidió extraer una tercera muestra (la segunda tras la intervención) pero en este caso el período de espera fue más corto, de tres a cinco meses. La intención en este grupo con esta tercera muestra era que durante la movilización pulmonar se podrían liberar células epiteliales no malignas que provocaran falsos positivos y que se detectarían en la muestra de las dos semanas. En cambio, pasado un tiempo, estas células habrían sufrido apoptosis o anoikis quedando solo detectables las malignas (107) (108).

Aquellos pacientes en los que se diagnosticó recidiva dentro de estos dos primeros años, se extrajo la MR en ese momento, suprimiendo la muestra o muestras posteriores. No se ha encontrado bibliografía en relación a este tipo

de extracciones, convirtiendo nuestros resultados en absolutamente originales.

Aunque hay artículos en los que no se discrimina inicialmente por estadios (75), en nuestro estudio se determinaron dos grupos diferenciados y basados en la clasificación TNM. Tras realizar esta separación, se establecieron diferentes momentos de extracción sanguínea, como se ha detallado previamente, debido a la diferencia de supervivencia entre ambos, pero en ambos casos basados en la premisa de las variaciones en las muestras pre y post-tratamiento.

### **Diferencias técnicas entre los distintos dispositivos**

La dificultad en la detección y aislamiento de CTC no es un problema nuevo, evidentemente, sino que ya fue reportado en los primeros intentos de esta investigación (50).

Los diferentes métodos de aislamiento y detección difieren en el proceso de enriquecimiento, tinción y detección, además de en la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. El método usado en el aislamiento y la detección de CTCs ha demostrado la variabilidad en el hallazgo de estas células, influyendo así en los resultados posteriores.

Nuestro centro poseía, previo al inicio de este estudio, el dispositivo CellSearch®, único aceptado por la FDA para la detección de CTCs en cáncer de mama, próstata y colorrectal.

Uno de los principales problemas es el escaso número de células tumorales en comparación con el resto de células sanguíneas, con una baja concentración celular.

Teniendo en cuenta su baja concentración y que la cantidad de sangre extraída son solo 7.5 ml, las probabilidades de conseguir aislar CTCs en nuestra muestra son escasas.

Además, el CellSearch® al basarse en el aislamiento de las CTCs según la expresión de EpCAM, DAPI, CK y CD45, se discrimina de forma negativa aquellas CTCs que presentan características mesenquimales tras el cruce de la ETM. Como ya se ha comentado, con el cruce de esta barrera las células pierden sus características epiteliales, pasando a tener marcadores mesenquimales y entrando en el torrente sanguíneo (84). Tras esta entrada sufren el proceso inverso, la barrera mesenquimo-epitelial, para así entrar de nuevo en otros órganos y metastatizar (109). Al basarse en una caracterización centrada en marcadores epiteliales, todas aquellas células que hayan “mutado” no serán adecuadamente aisladas (81). Las células incluso pueden presentar un fenotipo híbrido, expresando marcadores epiteliales y mesenquimales (110). Esta diferencia de detección se reflejó en el artículo de Hofman (76), tras comparar la capacidad de detección por parte de CellSearch® y de ISET®, obteniendo un 39% de detección con el primero y un 50% con ISET®. A pesar de esta diferencia, en ambos casos se relacionó con una peor SLE. Esta diferencia de detección fue incluso superior en el estudio de Krebs (111). En este caso, también compararon el grado de detección de CTCs en pacientes en estadios III y IV entre ISET® y CellSearch®, con resultado de 80% y 23% respectivamente.

Los estudios realizados usando CellSearch® en tumores no metastásicos, dependiendo de la histología, reportan de un 5 a un 30% de detección de CTCs (112).



El porcentaje de detección en el estudio de Sawabata usando el dispositivo ScreenCell®, basado en la selección por tamaño, varió desde el 4,3% al 82,6% según el momento de extracción de la sangre y de dónde se obtuvo la muestra (113). Estos resultados nos vuelven al problema comentado previamente, la necesidad de un protocolo que estandarice la detección de las CTCs y facilite su uso en la práctica clínica.

Sería sencillo pensar que la solución del problema de detección de los dispositivos basados en características epiteliales es desarrollar dispositivos de detección basados en marcadores mesenquimales, pero hay que evitar todos aquellos que se presenten en células no tumorales como ocurre con la vimentina que aparece en la superficie de células sanguíneas (83).

Debemos también tener en cuenta la heterogeneidad de los tumores epiteliales. Esta heterogeneidad no solo se ha observado entre el tumor primario y las metástasis, sino también dentro del mismo primario (114). Además se puede extrapolar a las CTCs dificultando nuevamente su detección y haciendo necesario el estudio de más de una CTC para asegurar qué alteraciones están presentes (56).

Pero, ¿y si en nuestros pacientes, sus células no solo han modificado las características de superficie celular, sino que también se han formado agregados celulares?. Este es otro de los problemas en la detección de CTCs, la presencia de cluster que al igual que las modificaciones en la membrana, dificultan enormemente la detección de las CTCs usando los marcadores determinados en el procesador Veridex (111) (115). Estos agregados pueden aislarse en el 50% de los pacientes con CPNCP marcando un peor pronóstico en estos pacientes (116). La detección de estos

acúmulos celulares puede realizarse con los dispositivos basados en el aislamiento por tamaño como el ISET® o el ScreenCell®, pero también con el dispositivo RosetteSep®, método de selección negativa de CD45 (103).

### **Relación de las CTCs con variables sociodemográficas**

Ni de forma global, ni en el estudio separado de ambos grupos, se ha hallado asociación de las variables sociodemográficas recogidas con la presencia de CTCs en M1 en nuestros pacientes. Este resultado va acorde con la gran mayoría de artículos donde esta posible relación es débil o permanece ausente (117) (118).

### **Relación de las CTCs con variables tumorales**

En nuestro caso, no se halló ninguna asociación entre la presencia de CTCs pretratamiento con las variables pronósticas clásicas: TNM clínico, TNM patológico (en el de pacientes operados), el tipo histológico y el grado de diferenciación.

Como ejemplo, en el grupo de pacientes en estadios precoces encontramos seis sujetos que presentaron un aumento de sus CTCs entre M1 y M2. Tras analizar las características tanto tumorales como quirúrgicas, solo observamos una heterogeneidad de éstas, sin poder determinar una característica específica que nos ayudara a explicar este aumento. La razón más plausible la podemos encontrar en la ausencia de detección de CTCs con marcadores mesenquimales, o como ocurre en otros trabajos, que la presencia o ausencia de CTCs no se relacione con ninguna de estas

características.

En la mayoría de artículos se observa una relación entre el TNM y un mayor número de CTCs, principalmente en estadios avanzados (73)(117). Sin embargo, el grupo Zhan y el de Hofamn no detectaron tal relación (119) (120).

En cambio en el artículo de Rolle, en los estadios precoces no se describió asociación de las CTCs con el tamaño tumoral ni la afectación ganglionar clínica (107).

A diferencia del TNM, la asociación entre las CTCs y el subtipo histológico presenta resultados contrarios, sin dejar claro si un diagnóstico de adenocarcinoma conlleva una mayor detección de CTCs que en el caso del escamoso y si esto tendría algún tipo de influencia pronóstica (101) (117).

### **Supervivencia de la muestra global en relación con la presencia de CTCs**

Al realizar el estudio estadístico incluyendo los 53 pacientes y centrándonos en la influencia de las CTCs en la SG, observamos que aquellos pacientes con CTCs en su M1 presentan una mediana de 19 meses, en comparación con el grupo con CTCs negativas cuya SG fue de 42 meses. A pesar de esta importante diferencia, los valores no fueron estadísticamente significativos. Es probable que la principal causa de esta ausencia de significación venga dada por un pequeño tamaño muestral, lo cual se hace aún más evidente cuando el estudio se realiza por grupos.

Similar resultado encontramos en relación a la SLE/SLP. Los pacientes con CTCs en M1 presentaron una mediana de SLE/SLP de 13 meses, mediana

que aumentó hasta los 41 meses en los que no se detectaron CTCs. Nuevamente, es el escaso número de pacientes el que dificulta la posibilidad de hallar diferencias estadísticamente significativas.

La variación en el número de CTCs entre las muestras M1 y M2 mostró, de igual manera, una tendencia hacia una peor SG y SLP/SLE sin alcanzar la significación estadística y volviendo a hacernos pensar en el tamaño de nuestro grupo.

Estos resultados invitan a realizar nuevos estudios relacionados con las CTCs pero con un tamaño muestral mayor.

### **Utilidad de las CTCs en estadios precoces**

El número de artículos sobre CTCs en pacientes diagnosticados de CPNCP en estadios precoces es mucho menor que en los avanzados, y lo es más aún si el dispositivo utilizado es el CellSearch.

Las principales esperanzas depositadas en la detección de CTCs en estos estadios es su aporte a una mejor estadificación que nos ayude a decidir con mayor seguridad si un paciente precisa tratamiento adyuvante o el diagnóstico precoz de recidiva, antes incluso de la visualización radiológica. Su papel como herramienta de screening parece posible, pero se necesita mayor evidencia científica para poder hacer uso total de ello. El proyecto AIR, cuyo objetivo principal es valorar la utilidad como herramienta de detección precoz de CP de las CTCs en pacientes de alto riesgo comenzó su reclutamiento en Octubre de 2015 finalizando en Febrero de 2018. Será en

Febrero de 2020 cuando acabe el seguimiento y se puedan conocer sus resultados (121).

A pesar de haber realizado varias extracciones a lo largo del seguimiento de los pacientes, en nuestro grupo la determinación de CTCs en cualquiera de las muestras obtenidas, tanto antes como después de la cirugía, no ha demostrado ningún tipo de relación en cuanto al pronóstico del CPNCP. Una mayoría de pacientes en este grupo no presentaron CTCs al diagnóstico (en 21 pacientes de 28 no se aislaron CTCs). Sin embargo la ausencia de las mismas no vino acompañada de un mejor pronóstico oncológico en términos de recurrencia o supervivencia. De nuevo nos enfrentamos a la duda de por qué estos pacientes no presentaron CTCs, o si al utilizar el dispositivo CellSearch no fuimos capaces de detectarlas. Otra cuestión es por qué los pacientes con CTCs no presentaron un peor pronóstico. Esto puede estar en relación a nuestro pequeño tamaño muestral, aunque encontramos artículos que obtienen tanto resultados similares a los nuestros, como opuestos con una  $n$  similar. El grupo de Lv, obtuvo resultados similares a los nuestros. A pesar de determinar CTCs tanto en sangre periférica como de vena pulmonar, no pudieron demostrar la relación de la presencia de éstas con la SG ni con la SLE en pacientes sometidos a cirugía (122). En cambio, Crosbie en su estudio (104), de características muy similares al nuestro ( $n= 30$ , mismo dispositivo y muestra pre-quirúrgica) sí que detectó una peor SLE en los pacientes que presentaban CTCs en sangre periférica, pero la diferencia en SG no fue significativa. Como ya se comentó previamente, también extrajeron sangre de la vena pulmonar pre-quirúrgicamente hallando un mayor número de CTCs en esta muestra. A pesar de este mayor recuento,

necesitaron marcar un punto de corte más alto (>18 CTCs) para que sus resultados fueran significativos. Puede ser difícil de explicar que con una sola CTC en la periferia se pueda determinar una peor SLE pero para una muestra central sean necesarias al menos 18 células. Podemos pensar nuevamente tanto en la apoptosis como en la anoikis que sufren las células, disminuyendo su número durante su recorrido en el torrente sanguíneo. Aún así, el autor insiste en la presencia de pacientes con recidiva sin aislamiento de CTCs, cuya explicación más plausible nuevamente es la posibilidad de no detección por pérdida de marcadores epiteliales de superficie.

De la misma manera que en la M1, en la mayoría de nuestros pacientes no se aislaron CTCs en las muestras siguientes. En la M2, 14 pacientes de 21 no presentaron CTCs. De los 20 pacientes con M3 únicamente ocho presentaron CTCs. En relación a la MR extraída exclusivamente en los nueve pacientes con recidiva, en seis el número de CTCs era igual a cero. A pesar de esta ausencia de CTCs los pacientes no presentaron ni una SG ni una SLE mayor de forma significativa que aquellos con CTCs.

Debido a este pequeño número de pacientes con presencia de CTCs, los análisis sobre las modificaciones en el recuento de células representan una *n* escasa. Aquí tampoco se detectaron diferencias significativas en lo que respecta a SG y SLE.

Al contrario que en nuestros resultados, el grupo de Bayarri sí que detectó una tasa de recurrencia mayor en aquellos pacientes en los que se aislaban CTCs en la muestra post-quirúrgica (77). Las principales diferencias con este estudio es el dispositivo de detección, usado en este caso el sistema MACS®, y el momento de extracción, un mes después de la resección.

Ambas diferencias evidentemente influyen en el grado de detección y en los resultados posteriores, pero al final ambos estudios no pueden ser claramente comparados por estas diferencias básicas.

Otro estudio con las mismas diferencias es el de Hofman (75). Aquí, mediante el empleo del método ISET®, basado en el tamaño, también se determinó que la presencia de CTCs se relacionaba con un peor pronóstico, afectando tanto la SLE como la SG en pacientes con CPNCP resecable, independientemente de su estadio. Nuevamente el método utilizado, ISET®, es diferente al nuestro y está basado en el tamaño, y el momento de extracción fue exclusivamente preoperatorio, pero según sus conclusiones las CTCs podrían usarse como factor pronóstico y ayudar tanto en el seguimiento como en la decisión de un tratamiento adyuvante.

Una de las razones que podemos argüir para justificar la ausencia de CTCs en las determinaciones de nuestros pacientes en estadios precoces, es esto mismo, su estadio. Probablemente ceñirnos únicamente a esta explicación sería erróneo y más si nos fijamos en el artículo de Ilie (123). Este estudio se centró en pacientes EPOC sin patología tumoral diagnosticada, en los que se estudió la presencia de CTCs y se realizó un TAC de control anual. Aquellos en los que se aislaron CTCs en la muestra fueron diagnosticados de CPNCP de 1 a 4 años después.

La posible principal razón, basándonos en lo referido previamente, es la no detección de CTCs por la pérdida de marcadores epiteliales, condición básica para el aislamiento con CellSearch®.

Lo que no se puede negar es que la presencia o no de CTCs en pacientes con estadios precoces es un tema controvertido. Por un lado hay algunos

autores que argumentan que es perfectamente lógico, puesto que en muchos de los casos puede traducir una biología del tumor más favorable o una menor capacidad invasiva del mismo, e incluso que si se hallan CTCs no hay “obligación” de presentar metástasis según la teoría “the seed and the soil”.

Por otro lado se da la paradoja, como ya hemos visto, que hay estudios que muestran este método como una herramienta de detección precoz de este tipo de tumores y han obtenido resultados satisfactorios. Muy probablemente la clave a esta pregunta no depende de un único factor y la respuesta requeriría un trabajo con muestras mucho más amplias de las que disponemos y con un protocolo universal establecido.

### **Utilidad de las CTCs en estadios avanzados**

El grueso de la bibliografía de las CTCs en el CPNCP gira en torno a estos pacientes, los diagnosticados en estadios avanzados. Los primeros estudios se centraron en ellos, como una posible herramienta no solo pronóstica, sino también para la monitorización de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de una probable recaída (124).

Aunque la estadificación mediante el sistema TNM es una clasificación exclusivamente anatómica, es la principal herramienta usada a la hora de determinar el pronóstico de nuestros pacientes. Para complementar esta clasificación, tenemos la ayuda anatomopatológica y de técnicas de biología molecular. Pero esto no es suficiente para estimar un pronóstico más acertado, tanto de forma individual como al grupo de pacientes con las mismas características. En la búsqueda de otro tipo de marcadores que ayudasen a estratificar de forma más precisa el pronóstico de los pacientes,



se pensó que la presencia de CTCs podría resultar de ayuda, condicionando un peor pronóstico en aquellos en los que se aislaran.

Pero no sólo hay que pensar en las detectadas al inicio, sino también en la manera en que sus variaciones posteriores al tratamiento nos pueden guiar mostrando una resistencia al mismo y ayudando a plantear un cambio de esquema de quimioterapia adyuvante, medir respuestas parciales o en la detección de una recaída precoz, quizás incluso antes de que esta pueda ser vista radiológicamente.

Se detectó la presencia de CTCs en el 50% del grupo en la muestra previa al inicio del tratamiento; sin embargo, este hallazgo no tuvo ninguna repercusión en términos pronósticos.

Al igual que en los estadios iniciales, aquí también hay disparidad de resultados. El grupo de Juan realizó un estudio en 37 pacientes usando CellSearch®, la detección de CTCs en sus muestras no mostró ningún tipo de influencia en la SG y SLP (74). A diferencia del estudio de Krebs et al. este grupo, con un diseño similar al nuestro pero con una  $n$  superior (101 pacientes) y utilizando CellSearch®, describió que los pacientes con más de cinco CTCs en la muestra pre-tratamiento tenían una SG y SLP más corta (73). Resultado similar es el que describió el grupo de Munielo-Romay, en el que se determinaron una peor SG y SLP en aquellos pacientes que se detectaban CTCs, tanto antes del inicio del tratamiento como tras el ciclo de QT (125). Evidentemente la potencia principal del estudio de Krebs frente al de Juan y al nuestro es su mayor  $n$ , siendo en nuestro caso una de las principales limitaciones.

En cambio, en nuestra serie, el aislamiento de CTCs en la muestra extraída

tras un ciclo de QT sí resultó de utilidad pronóstica. Concretamente, aquellos pacientes con CTCs en su M2 presentaron una peor SG (5 meses vs 19 meses) y una peor SLP (4 meses vs 8 meses), aunque esta última no alcanzó la significación estadística. Hallazgos parecidos al nuestro han sido descritos por otros autores. Los principales ejemplos los encontramos en los estudios de Krebs (73) y Juan (74) que obtuvieron un resultado similar, con una relación inversa entre el número de CTCs y los meses de SG y de SLP. Pero de nuevo encontramos que, aunque el diseño es similar y los resultados finales también, el punto de corte de las CTCs varía inter-estudios. Krebs lo marcó en cinco, Juan en dos CTCs y a nuestro grupo le bastó una única CTC para tener un peor pronóstico. Existen otros trabajos en que ha sido necesario un punto de corte más alto (ocho CTCs) para hallar diferencias significativas, como ocurre en el estudio de Zhang (119).

Esta relación entre la persistencia de CTCs y un peor pronóstico puede sugerir una resistencia al tratamiento y una erradicación incompleta, incluso si no hay metástasis detectadas (79). La falta de respuesta a la QT y su asociación con un mayor número de CTCs quedó reflejado, por ejemplo, en el artículo de Hirose (126).

Sin embargo, hay artículos que incluso habiendo detectado una influencia negativa de las CTCs sobre la supervivencia, no encontraron correlación entre éstas y la respuesta al tratamiento (117) (124). Este tipo de hallazgos nos hace plantearnos si la calidad de los estudios es suficiente para poder considerar las CTCs como evaluadoras de respuesta o si debemos insistir en mejorar la metodología para que las conclusiones sean más sólidas.

A pesar de pertenecer a estadios avanzados, en los que la carga tumoral se

supone mayor, en nuestro estudio hay un alto porcentaje de pacientes (50%) en los que no se detectaron CTCs. La pregunta de por qué no fueron detectadas es recurrente, al igual que la respuesta. La razón probablemente más plausible es la misma que en estadios precoces, la ausencia de marcadores epiteliales. La siguiente pregunta es porqué si hay un 50% de pacientes con CTCs cuya mediana de SG fue de seis meses respecto a los 11 de los pacientes sin CTCs, ésta diferencia no fue estadísticamente significativa. En este caso la respuesta se limita al pequeño número de pacientes reclutados, limitando así el estudio estadístico y las posibles conclusiones a extraer.

A pesar de la disparidad de resultados que hemos visto que se pueden obtener dependiendo del tipo de pacientes, características tumorales y diseño del estudio, incluyendo el dispositivo de detección usado, hay una importante baza a favor de las CTCs a parte de su posible influencia pronóstica: su potencial ayuda en la obtención de material tumoral, tradicionalmente invasiva, para caracterización molecular. A pesar de que el dispositivo CellSearch® mantiene la integridad de las células permitiendo su análisis (79), este campo no fue desarrollado ni estudiado en nuestro trabajo, aunque creemos imprescindible hacer referencia a él por su importancia en relación al CPNCP.

Se ha visto que no solo se pueden detectar células viables en los pacientes con cáncer, sino también apoptóticas. Son las células viables las capaces de producir metástasis, por lo que nuestro esfuerzo debe ir dirigido a su aislamiento y análisis (127). Aún así, hay autores que insisten en el estudio de los marcadores apoptóticos, ya que sí se ha visto que su presencia puede

correlacionarse con un peor pronóstico (128).

La mayoría de los pacientes que diagnosticamos de CPNCP se encuentran en estadios avanzados, pudiendo solo ofrecerles tratamiento basado en QT/RT. Durante la evolución de la enfermedad se pueden producir mutaciones en las células tumorales que condicionen resistencias a los tratamientos que administramos, lo cual obliga a conseguir nuevas muestras para estudio molecular (129). La importancia de esta caracterización molecular quedó reflejada con la demostración en 2004 por los grupos de Lynch (130) y Paez (131) en relación a las mutaciones de EGFR y la respuesta al tratamiento de los pacientes que las presentaban.

Esta caracterización la llevó a cabo el grupo de Maheswaran realizando el análisis mutacional de EGFR en pacientes con CPNCP en el ADN recuperado de las CTCs aisladas. Las mutaciones esperadas fueron halladas en el 92% de los casos (90).

Sin embargo, las mutaciones de EGFR no son las únicas que pueden ser detectadas en las CTCs.

El receptor MET, otra diana de los ITK, fue analizado para valorar la efectividad de las CTCs en el estudio de su sobreexpresión. Se obtuvieron mejores resultados al realizar este análisis con ISET® que si el método utilizado era CellSearch® (132).

Ilie et al, utilizando ISET® describieron la posibilidad de detectar las reordenamientos de ALK en CTCs de pacientes con adenocarcinoma mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (133).

El grupo de Aieta detectó la presencia de CTCs con alteraciones de ALK

utilizando CellSearch® y controló su evolución durante el tratamiento. Observaron una correlación entre los niveles de CTCs con alteraciones para ALK y la respuesta o resistencia a crizotinib (134). La detección de reordenamientos de ALK también la llevo a cabo el grupo de He, pero esta vez utilizando el método Nanovelcro-chip y describiendo una mayor detección que con CellSearch® (135).

Otro gen con capacidad mutagénica y que puede ser analizado en las CTCs es ROS-1. El grupo de Paillet consiguió detectar reordenamientos en ROS-1 analizando CTCs de pacientes en estadios avanzados de CPNCP (136).

La utilidad de los anticuerpos anti-PD-L1 (programmed death ligand 1) ha quedado demostrada y por lo tanto la importancia de su detección (137). El grupo de Nicolazzo consiguió detectar la expresión de PD-L1 en CTCs aisladas mediante CellSearch®, determinando que aquellos pacientes con una persistencia de CTCs con PD-L1 positivo presentaban una peor SLP (138).

### **Comparativa con otra tecnología: ADN circulante tumoral**

El interés en el desarrollo de técnicas que ayuden tanto al diagnóstico, tratamiento y pronóstico del CPNCP no solo se ha centrado en las CTCs. Este interés también ha contribuido al ámbito del ADNct, que se inició hace años (139), y ha resurgido centrándose en la detección de alteraciones genómicas (140), el cribado del genoma del ADNct y la relación con el pronóstico (141).

A pesar de que hay investigadores que defienden que el ADNct ha superado en su objetivo a las CTCs, este método aún está lejos de ser perfecto. Las

condiciones previas a la extracción sanguínea deberían estar estandarizadas para facilitar la reproducibilidad de los estudios (142) (143).

También hay que tener en cuenta la premura con la que se debe procesar y almacenar la muestra tras su extracción. Si se demora el análisis, el riesgo de liberación de ADN por parte de las células sanguíneas tras su lisis aumenta y podría alterar los resultados (91). En comparación con las CTCs analizadas con CellSearch® que pueden permanecer hasta 72 horas tras su extracción.

Aunque es cierto que la detección de CTCs por CellSearch fue aprobada por la FDA para diferentes tumores, no lo ha sido para el CPNCP. Esta aprobación sí ha sido conseguida por el ADNct que fue aceptado por la misma institución en 2016 como la primera prueba de biopsia líquida para pacientes con CPNCP, pero únicamente para analizar la presencia de mutaciones específicas y así identificar sujetos elegibles para el tratamiento dirigido a EGFR (144).

De la misma manera que en la detección de CTCs nos podemos encontrar con falsos negativos (por ejemplo, no detección por estar basado en EpCAM o por presentar un menor tamaño) y con falsos positivos (al dar por válida una célula con características similares a una tumoral sin realmente serlo), en el análisis de ADNct también podemos encontrar estos problemas. Al igual que las células tumorales liberan ADN al torrente sanguíneo, las células no tumorales realizan el mismo proceso, pudiendo contaminar la muestra. Además su alta sensibilidad puede detectar alteraciones moleculares que no tienen significación oncológica.

Ya se comentó lo excepcionales que son las CTCs en comparación con el número total de las células sanguíneas. El ADNct no es ajeno a este

problema. Debemos tener en cuenta que el ADNct es una pequeña porción del ADNc total, lo que también dificultaría su detección (<1%) (87). Esta pequeña porción además podría variar según diferentes características del tumor, como pueden ser el estadio (en estadio I solo se aísla en el 50% de los pacientes) (88), la carga tumoral, el número de metástasis (145), su localización y su cercanía a estructuras vasculares, características biológicas como la tasa de apoptosis y su potencial metastásico (91) e incluso con la presencia de otras enfermedades benignas como trastornos hepáticos, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares o infecciones.

Así mismo, habría que valorar que si el ADNc que analizamos proviene de las células que sufren apoptosis, puede que no se esté analizando el ADNc “más correcto”. Es posible que las células que no mueren, sean las más agresivas y más resistentes al tratamiento mientras que nosotros nos centramos en las ya no viables, con el problema de la heterogeneidad del que ya hemos hablado.

Un aspecto importante del uso de las diferentes biopsias líquidas es su uso como factor pronóstico. En el caso del ADNct, el grupo de Sirera et al describieron una SG y SLP menores en pacientes en estadios avanzados con niveles de ADNc más bajos (146). En cambio, nuevamente nos encontramos con otro artículo que refuta esta afirmación. Li estudió a 103 pacientes en estadios avanzados de CPNCP, así como la presencia de ADNct previo al tratamiento y tras 6 y 12 semanas de su inicio, sin hallar relación entre el ADNc y la SG o la SLP (147). Similar resultado describió el grupo de Ludovini en pacientes sometidos a cirugía. El ADNct aislado en la muestra

pretratamiento no mostró relación con la SG ni la SLE (148).

La detección de mutaciones moleculares, al igual que en las CTCs, también se puede realizar en muestras de ADNc. Probablemente en este campo, el análisis de ADNct sea más factible ya que no precisa ningún tipo de enriquecimiento previo, al contrario que las CTCs. Pero las posibilidades que ofrecen las CTCs para el análisis de propiedades biológicas de las células in vitro e in vivo van mucho más allá de la secuenciación del ADN fragmentado presente en el plasma sanguíneo.

En el caso de Maheswaran, tras analizar mutaciones de EGFR tanto en CTCs y ADNct en los mismos pacientes, describieron que la determinación de estas mutaciones era más sensible al realizarlo en CTCs que en el ADNc (90). En cambio, Sundaresan et al describieron que aunque el hallazgo de estas mutaciones era similar en las CTCs y el ADNc, el beneficio final provenía de la unión de ambas, consiguiendo un 93% de identificación (149).

En el estudio de Sacher, no solo se centraron en la identificación de mutaciones de EGFR, sino que ampliaron a reordenamientos de ALK en pacientes en estadios avanzados con una alta especificidad y valor predictivo positivo (145).

Las ventajas y desventajas de la detección de CTCs y del ADNct quedan reflejadas en la figura 43 (91).



	Ventajas	Limitaciones
<b>CTCs</b>	Procedimiento mínimamente invasivo con alta especificidad. Estudia heterogeneidad tumoral. Evaluación estructural del fenotipo tumoral. Información sobre metástasis y progresión tumoral. Ensayos in vivo e in vitro. Caracterización molecular. Técnicas de inmunomarcaje. Información complementaria al ADNct. Facilitar toma decisiones terapéuticas.	Necesidad estudios prospectivos para detectar diferencias pre-analíticas. Población escasa y frágil. Necesidad dispositivos con alta sensibilidad y especificidad. Falsos positivos y negativos. Baja "signal-to-noise ratio", principalmente en precoces. Dificultad detección por heterogeneidad celular. Disparidad entre los dispositivos de aislamiento de CTCs.
<b>ADNct</b>	Procedimiento mínimamente invasivo con alta especificidad. Estudia heterogeneidad tumoral. Alta sensibilidad en la detección de carga tumoral. Posible valoración de resistencias terapéuticas. Facilitar toma decisiones terapéuticas.	Necesidad estudios prospectivos para detectar diferencias pre-analíticas. Falsos positivos y negativos. Baja "signal-to-noise ratio", principalmente en precoces. Falta de estandarización de condiciones preanalíticas. Imposibilidad de estudios funcionales o de proteínas.

Figura 43. Ventajas y limitaciones de CTCs y ADNct (91).

Al igual que ocurre con las CTCs, una parte importante de los trabajos sobre ADNct en CPNCP se centra en estadios avanzados. Es necesario por tanto el desarrollo de estudios en estadios iniciales, donde el aislamiento puede ser más dificultoso, pero cuya utilidad será valiosa para el seguimiento de estos pacientes.

La principal duda es, cuál de los dos puede ofrecernos más ayuda. Lo que debemos tener claro es que no debemos centrarnos únicamente en el desarrollo de una u otra técnica, ya que hemos visto que son complementarias, pudiendo obtener ventajas diferentes de cada una de ellas. El grupo de Calabuig recomienda el uso de ADNct para analizar mutaciones, alteraciones en el número de copias y cambios en la metilación del ADN. En cambio, insisten en las posibilidades de estudiar a las CTCs de forma completa, pudiendo realizar un perfil molecular basado en proteínas, ADN y ARN, y su estudio in vivo e in vitro, como ya comentamos (91).

Hay que recordar que ambas pueden ayudarnos en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con CPNCP, aunque sin olvidar la

necesidad de más estudios con unos estándares marcados que seguir.

### **Limitaciones del estudio**

Posiblemente la principal limitación de nuestro estudio es el tamaño muestral. Es cierto que muchas de las investigaciones que nos encontramos en la literatura presentan una  $n$  similar (74), (77), (104). Aún así los resultados y conclusiones de un estudio con 53 pacientes (28 pacientes en estadios precoces y 25 pacientes en estadios avanzados) son limitados y de menor potencia estadística que los que se pueden obtener con una  $n$  superior (73) (75).

La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el grupo de pacientes en estadios precoces, principalmente en relación a la supervivencia, podemos teorizar que se debe al tamaño muestral, precisando la realización de estudios con mayor número de pacientes para aclarar esta incógnita.

La razón principal de esta  $n$ , es la limitación de fondos económicos. Las detecciones de CellSearch® son de un alto coste, lo que provocó que hubiera que reducir el número de pacientes en pro de completar el calendario de extracción marcado. Hay algún grupo que ha desarrollado dispositivos con un menor coste lo que facilitaría no solo su uso en estudios obteniendo una mayor  $n$ , sino también la inclusión en la práctica clínica, siempre y cuando se validara su uso (150).

A pesar de haber sido realizadas las extracciones en dos grupos diferentes de pacientes, el estudio que se presenta es unicéntrico registrando únicamente pacientes del Hospital Clínico San Carlos, por lo que se debería

realizar un estudio con una mayor  $n$ , multicéntrico y si lo hubiera, siguiendo un protocolo de extracción.

En varios de los artículos publicados, se incluyó grupo control. Habitualmente encontramos que está compuesto por individuos sanos y pacientes con enfermedades benignas (151). En algunos de ellos se describe la presencia de CTCs en estos pacientes (152), habitualmente en un rango inferior al punto de corte marcado, y aún así sin poder determinar si su presencia se relacionará con la aparición de un tumor no diagnosticado, como en el estudio de Ilie (123), o si está relacionada con un falso positivo. En nuestro estudio, nuevamente debido a las limitaciones económicas, prescindimos del reclutamiento de pacientes sin diagnóstico de CPNCP.

Tras lo comentado previamente puede quedar la sensación de que la determinación de CTCs tiene un campo limitado en la aplicación clínica, con una gran disparidad de resultados, pero no es esa la idea con la que debemos quedarnos. Debemos conseguir mejores niveles de evidencia para lo que serían necesarios múltiples cambios. Estos cambios deberían basarse en:

- Alcanzar un consenso en el diseño de los estudios y en la interpretación de los datos obtenidos hasta la fecha y así facilitar la reproducibilidad de estos.
- Homogeneizar las series de pacientes para evitar factores de confusión. Esto es de principal interés en las series quirúrgicas en las que deben cumplirse criterios estrictos de resección completa como hemos comentado.
- Llevar a cabo estudios con un mayor tamaño muestral.

- Mejorar la sensibilidad y especificidad de los dispositivos, aumentando la capacidad de detección de CTCs con diferentes marcadores superficiales.
- Disminución del coste asociado a las determinaciones.

Todo esto podría ayudarnos a mejorar el tratamiento personalizado, la atención general del paciente y su calidad de vida.

# ***CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES

- 1- No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las variables sociodemográficas y la presencia de CTCs en la muestra pre-tratamiento.
- 2- La presencia de CTCs en la muestra extraída previa al inicio del tratamiento correspondiente no se relacionó con otras variables tumorales con demostrada significación pronóstica, tales como el estadio, el tipo histológico o el grado de diferenciación.
- 3- La presencia de CTCs en pacientes en estadios avanzados de CPNCP en la muestra extraída previa al inicio de tratamiento oncológico no mostró diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a pronóstico de la enfermedad, sin afectar a la supervivencia global ni a la supervivencia libre de progresión.
- 4- La presencia de CTCs en la muestra extraída tras un ciclo de quimioterapia en pacientes en estadio IIIB-IV de CPNCP, se asoció a una supervivencia global más corta que en aquellos en los que no se aislaron CTCs. Esta diferencia no se observó en relación a la supervivencia libre de progresión.
- 5- La presencia de CTCs en la muestra pre-tratamiento, la extraída al año y a los dos años de la cirugía y aquella en el momento de la recidiva en pacientes cuyo diagnóstico se realizó en fases precoces de CPNCP no se reveló como factor pronóstico en relación a la supervivencia global o a la supervivencia libre de enfermedad.

6- Las variaciones en el número de las CTCs entre las muestras extraídas, tanto la pre-tratamiento como las extraídas en el seguimiento, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia global o supervivencia libre de enfermedad ni en los pacientes en estadios iniciales ni en estadios avanzado.

## ***ANEXOS***



## ANEXOS

### ANEXO 1. Consentimiento informado

#### **CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE ESTUDIO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES INTERVENIDOS DE CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN EN ESTADIOS LOCALIZADOS: EVALUACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO PARA LA RECIDIVA.**

##### **Propósito**

Usted ha sido diagnosticado e intervenido de un cáncer no microcítico de pulmón en una fase en la que no existen metástasis a distancia en el momento actual. En función de determinados parámetros clínicos y anatomopatológicos, su oncólogo le explicará la necesidad o no de realizar un tratamiento de quimioterapia para reducir el riesgo de una recaída, en función de los estándares actuales vigentes.

La Institución que le va a tratar y vigilar en el futuro, está llevando a cabo un estudio para identificar células tumorales circulantes en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón en estas etapas, con el fin de conocer el valor pronóstico de la presencia de dichas células en sangre periférica. Además, se pretende conocer si la aparición o incremento en el número de las mismas predice un subgrupo de pacientes con mayor probabilidad de presentar una recaída de la enfermedad. Por el momento se desconoce el significado clínico de dicho hallazgo.

##### **¿En qué consiste el estudio y que riesgos existen?**

Su participación en este estudio es voluntaria.

Para participar en el estudio únicamente necesitamos que nos permita obtener 10ml de sangre mediante punción de vena periférica. La extracción sanguínea que se le va a realizar puede causar hematoma local, pero el que usted no acepte entrar en este estudio, no le excluirá de las extracciones sanguíneas correspondiente al seguimiento de su enfermedad y con las que se hará coincidir las analíticas para este estudio. Se le pedirá una muestra

antes de la cirugía, y 2 muestras más tras ésta que se harán coincidir con la realización de las pruebas de vigilancia que su oncólogo/cirujano le indicará para esas fechas, y que son habituales para el seguimiento de esta enfermedad.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre de Protección de datos de carácter personal y en el Real Decreto que lo desarrollo, 1720/2007. De acuerdo con lo que establece la legislación vigente, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estará identificados mediante un código y sólo su médico y colaboradores del estudio podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le puede identificar directamente. En el caso que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del presente estudio y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

**Beneficios:** La participación en este estudio no le garantiza beneficio seguro, pero si existe un potencial beneficio colectivo, haciendo que en el futuro se disponga de posible factor pronóstico/diagnóstico de recidiva precoz.

Tampoco recibirá ningún pago o compensación por participar en este estudio.

Habiendo comprendido lo anteriormente expuesto, doy mi consentimiento para participar en el estudio anteriormente indicado, en el entendimiento de que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento.

En ..... a ..... de ..... de .....

Firma del paciente o representante legal

Firma del médico

## ANEXO 2. Informe de Comité de Ética



### Informe Dictamen Protocolo Favorable Otros Estudios

C.P. - C.I. 11/082-E

23 de marzo de 2011

CEIC Hospital Clínico San Carlos

#### INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

DÑA M<sup>a</sup> DEL MAR GARCÍA ARENILLAS, SECRETARIA DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID.

#### **CERTIFICA**

Que en el estudio titulado: ***"Estudio de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes intervenidos por cáncer de pulmón no microcítico con intención curativa. Estudio de su valor pronóstico y de su correlación con la respuesta terapéutica"*** con código Interno: 11/082-E.

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto por el **Dr. Florentino Hernando** del Servicio de Cirugía Torácica, del Hospital Clínico San Carlos como Investigador Principal.

Lo que firmo en Madrid, a 23 de marzo de 2011

Fdo: Dra. Mar García Arenillas  
Secretaria del CEIC Hospital Clínico San Carlos

### ANEXO 3. Concesión Beca Fundación Mutua Madrileña.

FUNDACIÓN  
MUTUAMADRILEÑA

Paseo de la Castellana, 36-38  
28046 Madrid  
Tel.: 91 592 28 36  
info@fundacionmutua.es  
www.fundacionmutua.es

**D<sup>a</sup>. TERESA CAMPOS DEL PALACIO**, Gerente de la Fundación Mutua Madrileña, con domicilio social en Madrid, Paseo de la Castellana, 36-38, C.I.F. G83729434.

#### CERTIFICO

Que la Fundación Mutua Madrileña, concedió en 2011, en su VIII Convocatoria de Ayudas a la Investigación, al proyecto de investigación (AP92792011) titulado: “Estudio de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes intervenidos por cáncer de pulmón no microcítico con intención curativa. Estudio de su valor pronóstico y de su correlación con la respuesta terapéutica”, en el que figura como investigador principal el Dr. D. Florentino Hernando Tranco, y como investigadores asociados los Dres. Elena Fernández; Javier Puente; Marta Vidaurreta; Joaquín Calatayud; Silvia Véganzones; Lucía Milla; José Luis González Larriba; Eduardo Díaz-Rubio y Antonio José Torres. El proyecto se desarrolló en el Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid, con una duración de 3 años.

Y para que produzca los efectos oportunos expido el presente en Madrid, a 22 de enero de 2019.



Teresa Campos del Palacio  
Gerente Fundación Mutua Madrileña

## ***BIBLIOGRAFÍA***

## *BIBLIOGRAFÍA*

1. Di Maio Massimo, Perrone Francesco, Morabito Aledssandro, La Rocca Antonello RG. Epidemiology and Aetiology of Lung Cancer. In: Lipowska Lucyna, editor. ESTS Textbook of Thoracic Surgery. 1<sup>o</sup> edición. Medycyna Praktyczna; 2014. p. 679–87.
2. Society AC. Lung and Bronchus [Internet]. Available from: [https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?\\_ga=2.222721819.1856335531.1520362052-2135258459.1520362052#!/cancer-site/Lung and bronchus](https://cancerstatisticscenter.cancer.org/?_ga=2.222721819.1856335531.1520362052-2135258459.1520362052#!/cancer-site/Lung%20and%20bronchus)
3. GECP. Las muertes por cáncer de pulmón en mujeres se triplican en los últimos 20 años [Internet]. <https://www.gecp.org/category/noticias/>. 2018 [cited 2018 Feb 1]. Available from: <https://www.gecp.org/las-muertes-por-cancer-de-pulmon-en-mujeres-se-triplican-en-los-ultimos-20-anos/>
4. Adler I. Primary Malignant Growths of the Lung and Bronchi. In: Primary Malignant Growths of the Lung and Bronchi.
5. WYNDER EL, GRAHAM EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. J Am Med Assoc [Internet]. 1950 May 27;143(4):329–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15415260>
6. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM, American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest [Internet]. 2007 Sep;132(3 Suppl):29S-55S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17873159>
7. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M,

- Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* [Internet]. 2013 Aug;14(9):813–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849838>
8. Darby S, Hill D, Doll R. Radon: a likely carcinogen at all exposures. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2001 Oct;12(10):1341–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762803>
  9. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* [Internet]. 2005 Jan 29;330(7485):223. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613366>
  10. Bach, P Ginsberg R. Epidemiology of Lung Cancer. In: *Lung Cancer (American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology)*. Pmph USA Ltd (July 1, 2002); 2002. p. 1–9.
  11. Parker MS, Leveno DM, Campbell TJ, Worrell JA, Carozza SE. AIDS-related bronchogenic carcinoma: fact or fiction? *Chest* [Internet]. 1998 Jan;113(1):154–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440583>
  12. Gallagher B, Wang Z, Schymura MJ, Kahn A, Fordyce EJ. Cancer incidence in New York State acquired immunodeficiency syndrome patients. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2001 Sep 15;154(6):544–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549560>
  13. KORST R GR. Diagnosis and Staging. In: *Lung Cancer (American*

- Cancer Society Atlas of Clinical Oncology). Pmph USA Ltd (July 1, 2002); 2002. p. 57–69.
14. García Luján R., Meneses Pardo JC. MPE. Técnicas diagnósticas endoscópicas y quirúrgicas. In: Ergon, editor. ACTUALIZACIÓN EN EL CARCINOMA BRONCOGÉNICO. 2010. p. 87–98.
  15. Vilmann P, Clementsen PF, Colella S, Siemsen M, De Leyn P, Dumonceau J-M, et al. Combined endobronchial and oesophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer. *Eur Respir J* [Internet]. 2015 Jul;46(1):40–60. Available from: <http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/09031936.00064515>
  16. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015 Sep;10(9):1243–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415335711>
  17. Butnor KJ, Beasley MB, Cagle PT, Grunberg SM, Kong FM, Marchevsky A, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary non-small cell carcinoma, small cell carcinoma, or carcinoid tumor of the lung. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2009;133(10):1552–9. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19792044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19792044)
  18. Moran, C Suster S. Non-Small Cell Carcinomas of the Lung. In: Elsevier, editor. Tumor and Tumor-Like Conditions of the Lung and Pleura. 1<sup>a</sup>. Saunders; 2010. p. 51–110.
  19. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-



- Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2007 Aug;2(8):706–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415312983>
20. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Survival following lobectomy vs limited resection for stage I lung cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 2005 Mar 28;92(6):1033–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756281>
21. Raman V, Yang C-FJ, Deng JZ, D’Amico TA. Surgical treatment for early stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* [Internet]. 2018 Apr;10(Suppl 7):S898–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29780636>
22. Pignon J-P, Tribodet H, Scagliotti G V, Douillard J-Y, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Jul 20;26(21):3552–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18506026>
23. Butts CA, Ding K, Seymour L, Twumasi-Ankrah P, Graham B, Gandara D, et al. Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely resected stage IB and II non-small-cell lung cancer: updated survival analysis of JBR-10. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jan 1;28(1):29–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933915>
24. Felip E, Rosell R, Maestre JA, Rodríguez-Paniagua JM, Morán T,

- Astudillo J, et al. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jul 1;28(19):3138–45. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516435>
25. Wang EH, Corso CD, Rutter CE, Park HS, Chen AB, Kim AW, et al. Postoperative Radiation Therapy Is Associated With Improved Overall Survival in Incompletely Resected Stage II and III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Sep 1;33(25):2727–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101240>
  26. Rieber J, Deeg A, Ullrich E, Foerster R, Bischof M, Warth A, et al. Outcome and prognostic factors of postoperative radiation therapy (PORT) after incomplete resection of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* [Internet]. 2016 Jan;91:41–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711933>
  27. Dartevelle PG, Mitilian D, Fadel E. Extended surgery for T4 lung cancer: a 30 years' experience. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2017 Jun;65(6):321–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28349384>
  28. Detterbeck F. What to do with “Surprise” N2?: intraoperative management of patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2008 Mar;3(3):289–302. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317073>
  29. Douillard J-Y, Rosell R, De Lena M, Riggi M, Hurteloup P, Mahe M-A, et al. Impact of postoperative radiation therapy on survival in patients with

- complete resection and stage I, II, or IIIA non-small-cell lung cancer treated with adjuvant chemotherapy: the adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA) Randomized. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2008 Nov 1;72(3):695–701. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439766>
30. Eberhardt WEE, De Ruyscher D, Weder W, Le Péchoux C, De Leyn P, Hoffmann H, et al. 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2015 Aug;26(8):1573–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897013>
  31. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2017;28(suppl\_4):iv1–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28881918>
  32. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT, Shepherd FA, Smith C, et al. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2009 Aug 1;374(9687):379–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19632716>
  33. Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J*

- Clin Oncol [Internet]. 2010 May 1;28(13):2181–90. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351327>
34. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines. Non-small cell lung cancer. 2018; Available from:  
[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nscl\\_blocks.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl_blocks.pdf)
35. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol [Internet]. 2016 Sep;27(suppl 5):v1–27. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27664245>
36. Hellman S, Weichselbaum RR. Oligometastases. J Clin Oncol [Internet]. 1995 Jan;13(1):8–10. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7799047>
37. Congedo MT, Cesario A, Lococo F, De Waure C, Apolone G, Meacci E, et al. Surgery for oligometastatic non-small cell lung cancer: long-term results from a single center experience. J Thorac Cardiovasc Surg [Internet]. 2012 Aug;144(2):444–52. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713303>
38. Bonnette P, Puyo P, Gabriel C, Giudicelli R, Regnard JF, Riquet M, et al. Surgical management of non-small cell lung cancer with synchronous brain metastases. Chest [Internet]. 2001 May;119(5):1469–75. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348955>
39. Salah S, Tanvetyanon T, Abbasi S. Metastatectomy for extra-cranial extra-adrenal non-small cell lung cancer solitary metastases: systematic

- review and analysis of reported cases. *Lung Cancer* [Internet]. 2012 Jan;75(1):9–14. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864934>
40. Leigh N. Small Cell Lung Cancer. In: Patterson, editor. *Pearson's Thoracic and Esophageal Surgery*. 3rd ed. Philadelphia: Patterson GA Churchill-Livingstone; 2008. p. 825–40.
  41. Spaggiari L. Small Cell Lung Cancer. In: Kuzdzal J, editor. *ESTS Textbook of Thoracic Surgery*. 1st ed. Cracow: Medycyna Praktyczna; 2014. p. 825–40.
  42. Früh M, De Ruyscher D, Popat S, Crinò L, Peters S, Felip E, et al. Small-cell lung cancer (SCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2013 Oct;24 Suppl 6:vi99-105. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23813929>
  43. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2004 Oct 15;10(20):6897–904. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501967>
  44. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* [Internet]. 2016 Jan 21;529(7586):298–306. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature17038>
  45. Ashworth TR. “A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death.” *Med J Aust*. 1869;14:146–147.

46. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 1989 Aug;8(2):98–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2673568>
47. Rodríguez-Salas N, Jiménez-Gordo AM, González E, de las Heras B, Zamora P, Espinosa E, et al. Circulating cancer cells in peripheral blood. A case report. *Acta Cytol* [Internet]. 44(2):237–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10740613>
48. ENGELL HC. Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. *Acta Chir Scand Suppl* [Internet]. 1955;201:1–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14387468>
49. KLASSEN KP, SELBACH GJ. THE PROGNOSTIC VALUE OF CYTOLOGIC STUDIES OF THE BLOOD OF PATIENTS WITH BRONCHOGENIC CARCINOMA. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 1965 Jul;50:127–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14313862>
50. CHRISTOPHERSON WM. CANCER CELLS IN THE PERIPHERAL BLOOD: A SECOND LOOK. *Acta Cytol* [Internet]. 9:169–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14325797>
51. Tanaka F, Yoneda K, Hasegawa S. Circulating tumor cells (CTCs) in lung cancer: current status and future perspectives. *Lung Cancer (Auckland, NZ)* [Internet]. 2010;1:77–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28210108>
52. Miller MC, Doyle G V, Terstappen LWMM. Significance of Circulating

- Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. J Oncol [Internet]. 2010;2010:617421. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016752>
53. Marrinucci D, Bethel K, Lazar D, Fisher J, Huynh E, Clark P, et al. Cytomorphology of circulating colorectal tumor cells:a small case series. J Oncol [Internet]. 2010;2010:861341. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111743>
54. Alix-Panabieres C, Vendrell J-P, Pelle O, Rebillard X, Riethdorf S, Muller V, et al. Detection and Characterization of Putative Metastatic Precursor Cells in Cancer Patients. Clin Chem [Internet]. 2007 Mar 1;53(3):537–9. Available from: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2006.079509>
55. Wang S, Liu K, Liu J, Yu ZT-F, Xu X, Zhao L, et al. Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers. Angew Chem Int Ed Engl [Internet]. 2011 Mar 21;50(13):3084–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374764>
56. Attard G, de Bono JS. Utilizing circulating tumor cells: challenges and pitfalls. Curr Opin Genet Dev [Internet]. 2011 Feb;21(1):50–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21112767>
57. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med [Internet]. 2004 Aug 19;351(8):781–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15317891>

58. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. Clin Cancer Res [Internet]. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4218–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857794>
59. Bidard F-C, Mathiot C, Delaloge S, Brain E, Giachetti S, de Cremoux P, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol [Internet]. 2010 Apr;21(4):729–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850639>
60. Franken B, de Groot MR, Mastboom WJB, Vermes I, van der Palen J, Tibbe AGJ, et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. Breast Cancer Res [Internet]. 2012 Oct 22;14(5):R133. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088337>
61. Tol J, Koopman M, Miller MC, Tibbe A, Cats A, Creemers GJM, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol [Internet]. 2010 May;21(5):1006–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861577>
62. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res [Internet]. 2008 Oct 1;14(19):6302–9. Available from:



- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829513>
63. Poveda A, Kaye SB, McCormack R, Wang S, Parekh T, Ricci D, et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2011 Sep;122(3):567–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664658>
64. Liu JF, Kindelberger D, Doyle C, Lowe A, Barry WT, Matulonis UA. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2013 Nov;131(2):352–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954902>
65. Bidard FC, Huguet F, Louvet C, Mineur L, Bouché O, Chibaudel B, et al. Circulating tumor cells in locally advanced pancreatic adenocarcinoma: the ancillary CirCe 07 study to the LAP 07 trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2013 Aug;24(8):2057–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676420>
66. Han L, Chen W, Zhao Q. Prognostic value of circulating tumor cells in patients with pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol* [Internet]. 2014 Mar;35(3):2473–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24218336>
67. Stephenson D, Nahm C, Chua T, Gill A, Mittal A, de Reuver P, et al. Circulating and disseminated tumor cells in pancreatic cancer and their role in patient prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Dec 5;8(63):107223–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29291024>

68. Wang Y-L, Liu C-H, Li J, Ma X-P, Gong P. Clinical significance of circulating tumor cells in patients with small-cell lung cancer. *Tumori* [Internet]. 2017 May 12;103(3):242–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28218384>
69. Grisanti S, Almici C, Consoli F, Buglione M, Verardi R, Bolzoni-Villaret A, et al. Circulating tumor cells in patients with recurrent or metastatic head and neck carcinoma: prognostic and predictive significance. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(8):e103918. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25105871>
70. Cho J-K, Lee GJ, Kim H-D, Moon UY, Kim M-J, Kim S, et al. Differential impact of circulating tumor cells on disease recurrence and survivals in patients with head and neck squamous cell carcinomas: An updated meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(9):e0203758. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30192876>
71. Zhang Z, Fan W, Deng Q, Tang S, Wang P, Xu P, et al. The prognostic and diagnostic value of circulating tumor cells in bladder cancer and upper tract urothelial carcinoma: a meta-analysis of 30 published studies. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 29;8(35):59527–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28938656>
72. von Felden J, Schulze K, Krech T, Ewald F, Nashan B, Pantel K, et al. Circulating tumor cells as liquid biomarker for high HCC recurrence risk after curative liver resection. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 27;8(52):89978–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163804>
73. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou J-M, Greystoke A, et

- al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Apr 20;29(12):1556–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422424>
74. Juan O, Vidal J, Gisbert R, Muñoz J, Maciá S, Gómez-Codina J. Prognostic significance of circulating tumor cells in advanced non-small cell lung cancer patients treated with docetaxel and gemcitabine. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2014 Jul;16(7):637–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217975>
75. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Feb 15;17(4):827–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098695>
76. Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay<sup>TM</sup> and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J cancer* [Internet]. 2011 Oct 1;129(7):1651–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21128227>
77. Bayarri-Lara C, Ortega FG, Cueto Ladrón de Guevara A, Puche JL, Ruiz Zafra J, de Miguel-Pérez D, et al. Circulating Tumor Cells Identify Early Recurrence in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer

- Undergoing Radical Resection. PLoS One [Internet]. 2016;11(2):e0148659. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26913536>
78. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* [Internet]. 1995;154(1):8–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8714286>
  79. Sun Y-F, Yang X-R, Zhou J, Qiu S-J, Fan J, Xu Y. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2011 Aug;137(8):1151–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21681690>
  80. Jakobsen KR, Demuth C, Sorensen BS, Nielsen AL. The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Transl lung cancer Res* [Internet]. 2016 Apr;5(2):172–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186512>
  81. Hou J-M, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* [Internet]. 2011 Mar;178(3):989–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356352>
  82. Pantel K, Alix-Panabieres C. Real-time Liquid Biopsy in Cancer Patients: Fact or Fiction? *Cancer Res* [Internet]. 2013 Nov 1;73(21):6384–8. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-13-2030>
  83. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells

- and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* [Internet]. 2012;63:199–215. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053740>
84. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2012 Dec;31(3–4):673–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733306>
  85. FINKEL GC, TISHKOFF GH. Malignant cells in a peripheral blood smear: report of a case. *N Engl J Med* [Internet]. 1960 Jan 28;262:187–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13822903>
  86. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Feb 20;32(6):579–86. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.45.2011>
  87. Bracht JWP, Mayo-de-las-Casas C, Berenguer J, Karachaliou N, Rosell R. The Present and Future of Liquid Biopsies in Non-Small Cell Lung Cancer: Combining Four Biosources for Diagnosis, Prognosis, Prediction, and Disease Monitoring. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2018 Sep 20;20(9):70. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11912-018-0720-z>
  88. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov* [Internet]. 2016;6(5):479–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26969689>
  89. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer*

- [Internet]. 2014 Jan 7;110(1):55–62. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263064>
90. Maheswaran S, Sequist L V, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura C V, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 Jul 24;359(4):366–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596266>
91. Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Herreros-Pomares A, Camps C. Circulating tumor cells versus circulating tumor DNA in lung cancer-which one will win? *Transl lung cancer Res* [Internet]. 2016 Oct;5(5):466–82. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826528>
92. Rami-Porta R, Wittekind C, Goldstraw P, International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) Staging Committee. Complete resection in lung cancer surgery: proposed definition. *Lung Cancer* [Internet]. 2005 Jul;49(1):25–33. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949587>
93. Porta RR. Estadificación ganglionar intraoperatoria en la cirugía del carcinoma broncogénico. Documento de consenso. *Arch Bronconeumol*. 2001;37(11):495–503.
94. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P, et al. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2009 May;4(5):568–77. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357537>

95. Levi F, Bosetti C, Fernandez E, Hill C, Lucchini F, Negri E, et al. Trends in lung cancer among young European women: the rising epidemic in France and Spain. *Int J cancer* [Internet]. 2007 Jul 15;121(2):462–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17373662>
96. Leal-López E, Sánchez-Queija I, Moreno C. Trends in tobacco use among adolescents in Spain (2002-2018). *Adicciones* [Internet]. 2019 Mar 28;1111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31017995>
97. Gallaway MS, Huang B, Chen Q, Tucker TC, McDowell JK, Durbin E, et al. Smoking and Smoking Cessation Among Persons with Tobacco- and Non-tobacco-Associated Cancers. *J Community Health* [Internet]. 2019 Feb 14; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30767102>
98. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl lung cancer Res* [Internet]. 2016 Jun;5(3):288–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27413711>
99. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2019 Jan;21(1):3–17. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1978-1>
100. Xu YH, Zhou J, Pan XF. Detecting circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Genet Mol Res* [Internet]. 2015 Sep 1;14(3):10352–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26345975>
101. Nieva J, Wendel M, Luttgen MS, Marrinucci D, Bazhenova L, Kolatkar A, et al. High-definition imaging of circulating tumor cells and associated

- cellular events in non-small cell lung cancer patients: a longitudinal analysis. *Phys Biol* [Internet]. 2012 Feb;9(1):016004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306961>
102. Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, Hashimoto M, Takuwa T, Kondo N, et al. Circulating tumor cells in pulmonary venous blood of primary lung cancer patients. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2009 Jun;87(6):1669–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19463575>
  103. Funaki S, Sawabata N, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Kadota Y, et al. Novel approach for detection of isolated tumor cells in pulmonary vein using negative selection method: morphological classification and clinical implications. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2011 Aug;40(2):322–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215651>
  104. Crosbie PAJ, Shah R, Krysiak P, Zhou C, Morris K, Tugwood J, et al. Circulating Tumor Cells Detected in the Tumor-Draining Pulmonary Vein Are Associated with Disease Recurrence after Surgical Resection of NSCLC. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016;11(10):1793–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27468936>
  105. Murlidhar V, Reddy RM, Fouladdel S, Zhao L, Ishikawa MK, Grabauskiene S, et al. Poor Prognosis Indicated by Venous Circulating Tumor Cell Clusters in Early-Stage Lung Cancers. *Cancer Res* [Internet]. 2017;77(18):5194–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28716896>
  106. Sawabata N, Okumura M, Utsumi T, Inoue M, Shiono H, Minami M, et al. Circulating tumor cells in peripheral blood caused by surgical



- manipulation of non-small-cell lung cancer: pilot study using an immunocytology method. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2007 May;55(5):189–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17554991>
107. Rolle A, Günzel R, Pachmann U, Willen B, Höffken K, Pachmann K. Increase in number of circulating disseminated epithelial cells after surgery for non-small cell lung cancer monitored by MAINTRAC(R) is a predictor for relapse: A preliminary report. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2005 Mar 31;3(1):18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15801980>
  108. Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1993 Sep;4(9):953–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257797>
  109. Kapeleris J, Kulasinghe A, Warkiani ME, Vela I, Kenny L, O’Byrne K, et al. The Prognostic Role of Circulating Tumor Cells (CTCs) in Lung Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2018;8:311. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30155443>
  110. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2011 Oct 25;105(9):1338–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21970878>
  111. Krebs MG, Hou J-M, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent

- approaches. J Thorac Oncol [Internet]. 2012 Feb;7(2):306–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173704>
112. Cabel L, Proudhon C, Gortais H, Loirat D, Coussy F, Pierga J-Y, et al. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. Int J Clin Oncol [Internet]. 2017 Jun;22(3):421–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28238187>
113. Sawabata N, Funaki S, Hyakutake T, Shintani Y, Fujiwara A, Okumura M. Perioperative circulating tumor cells in surgical patients with non-small cell lung cancer: does surgical manipulation dislodge cancer cells thus allowing them to pass into the peripheral blood? Surg Today [Internet]. 2016 Dec;46(12):1402–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951195>
114. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. Nature [Internet]. 2013 Sep 19;501(7467):338–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048066>
115. Hou J-M, Krebs M, Ward T, Morris K, Sloane R, Blackhall F, et al. Circulating tumor cells, enumeration and beyond. Cancers (Basel) [Internet]. 2010 Jun 9;2(2):1236–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281115>
116. Cho EH, Wendel M, Luttgen M, Yoshioka C, Marrinucci D, Lazar D, et al. Characterization of circulating tumor cell aggregates identified in patients with epithelial tumors. Phys Biol [Internet]. 2012 Feb;9(1):016001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306705>

117. Zhou J, Dong F, Cui F, Xu R, Tang X. The role of circulating tumor cells in evaluation of prognosis and treatment response in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2017;79(4):825–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28289866>
118. Ma X-L, Xiao Z-L, Liu L, Liu X-X, Nie W, Li P, et al. Meta-analysis of circulating tumor cells as a prognostic marker in lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2012;13(4):1137–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22799295>
119. Zhang Z, Xiao Y, Zhao J, Chen M, Xu Y, Zhong W, et al. Relationship between circulating tumour cell count and prognosis following chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Respirology* [Internet]. 2016 Apr;21(3):519–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26661896>
120. Hofman V, Long E, Ilie M, Bonnetaud C, Vignaud JM, Fléjou JF, et al. Morphological analysis of circulating tumour cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumour cell (ISET) method. *Cytopathology* [Internet]. 2012 Feb;23(1):30–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21210876>
121. Leroy S, Benzaquen J, Mazzetta A, Marchand-Adam S, Padovani B, Israel-Biet D, et al. Circulating tumour cells as a potential screening tool for lung cancer (the AIR study): protocol of a prospective multicentre cohort study in France. *BMJ Open* [Internet]. 2017;7(12):e018884. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29282271>

122. Lv C, Zhao B, Wang L, Zhang P, Ma Y, Wang Y, et al. Detection of circulating tumor cells in pulmonary venous blood for resectable non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* [Internet]. 2018 Jan;15(1):1103–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29422972>
123. Ilie M, Hofman V, Long-Mira E, Selva E, Vignaud J-M, Padovani B, et al. “Sentinel” circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(10):e111597. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25360587>
124. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BGM, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 Apr 15;18(8):2391–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492982>
125. Muinelo-Romay L, Vieito M, Abalo A, Nocelo MA, Barón F, Anido U, et al. Evaluation of Circulating Tumor Cells and Related Events as Prognostic Factors and Surrogate Biomarkers in Advanced NSCLC Patients Receiving First-Line Systemic Treatment. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2014 Jan 21;6(1):153–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24452143>
126. Hirose T, Murata Y, Oki Y, Sugiyama T, Kusumoto S, Ishida H, et al. Relationship of circulating tumor cells to the effectiveness of cytotoxic chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncol Res* [Internet]. 2012;20(2–3):131–7. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193919>
127. Pantel K, Alix-Panabières C. Functional Studies on Viable Circulating Tumor Cells. Clin Chem [Internet]. 2016 Feb;62(2):328–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26637479>
  128. Smerage JB, Budd GT, Doyle G V, Brown M, Paoletti C, Muniz M, et al. Monitoring apoptosis and Bcl-2 on circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. Mol Oncol [Internet]. 2013 Jun;7(3):680–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538216>
  129. Moreira AL, Thornton RH. Personalized medicine for non-small-cell lung cancer: implications of recent advances in tissue acquisition for molecular and histologic testing. Clin Lung Cancer [Internet]. 2012 Sep;13(5):334–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424871>
  130. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med [Internet]. 2004 May 20;350(21):2129–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118073>
  131. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science [Internet]. 2004 Jun 4;304(5676):1497–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118125>
  132. Ilie M, Szafer-Glusman E, Hofman V, Long-Mira E, Suttman R, Darbonne W, et al. Expression of MET in circulating tumor cells correlates with expression in tumor tissue from advanced-stage lung

- cancer patients. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Apr 18;8(16):26112–21.  
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28212540>
133. Ilie M, Long E, Butori C, Hofman V, Coelle C, Mauro V, et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2012 Nov;23(11):2907–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735679>
  134. Aieta M, Facchinetti A, De Faveri S, Manicone M, Tartarone A, Possidente L, et al. Monitoring and Characterization of Circulating Tumor Cells (CTCs) in a Patient With EML4-ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2016;17(5):e173–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27397482>
  135. He W, Xu D, Wang Z, Xiang X, Tang B, Li S, et al. Detecting ALK-rearrangement of CTC enriched by nanovelcro chip in advanced NSCLC patients. *Oncotarget*. 2016.
  136. Pailler E, Auger N, Lindsay CR, Vielh P, Islas-Morris-Hernandez A, Borget I, et al. High level of chromosomal instability in circulating tumor cells of ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2015 Jul;26(7):1408–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25846554>
  137. Jia M, Feng W, Kang S, Zhang Y, Shen J, He J, et al. Evaluation of the efficacy and safety of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibody in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis. *J Thorac Dis* [Internet]. 2015 Mar;7(3):455–61. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922725>
138. Nicolazzo C, Raimondi C, Mancini M, Caponnetto S, Gradilone A, Gandini O, et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:31726. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27553175>
139. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* [Internet]. 1996 Sep;2(9):1035–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782464>
140. Alix-Panabières C, Pantel K. Real-time liquid biopsy: circulating tumor cells versus circulating tumor DNA. *Ann Transl Med* [Internet]. 2013 Jul;1(2):18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25332962>
141. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem* [Internet]. 2006 Oct;52(10):1833–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423903>
142. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011 Jun;11(6):426–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562580>
143. Torga G, Pienta KJ. Patient-Paired Sample Congruence Between 2 Commercial Liquid Biopsy Tests. *JAMA Oncol* [Internet]. 2018 Jun

- 1;4(6):868–70. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29242909>
144. Lim M, Kim C-J, Sunkara V, Kim M-H, Cho Y-K. Liquid Biopsy in Lung Cancer: Clinical Applications of Circulating Biomarkers (CTCs and ctDNA). *Micromachines* [Internet]. 2018 Feb 28;9(3). Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30424034>
145. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O’Connell A, Feeney N, et al. Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol* [Internet]. 2016 Aug 1;2(8):1014–22. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27055085>
146. Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, Sanmartín E, Blasco A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2011 Feb;6(2):286–90. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252717>
147. Li BT, Drilon A, Johnson ML, Hsu M, Sima CS, McGinn C, et al. A prospective study of total plasma cell-free DNA as a predictive biomarker for response to systemic therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancers. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2016 Jan;27(1):154–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487589>
148. Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, Floriani I, Rulli E, Piattoni S, et al. Plasma DNA, microsatellite alterations, and p53 tumor mutations are associated with disease-free survival in radically resected non-small cell



- lung cancer patients: a study of the perugia multidisciplinary team for thoracic oncology. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2008 Apr;3(4):365–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18379354>
149. Sundaresan TK, Sequist L V, Heymach J V, Riely GJ, Jänne PA, Koch WH, et al. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 Mar 1;22(5):1103–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26446944>
150. Chen J-F, Zhu Y, Lu Y-T, Hodara E, Hou S, Agopian VG, et al. Clinical Applications of NanoVelcro Rare-Cell Assays for Detection and Characterization of Circulating Tumor Cells. *Theranostics* [Internet]. 2016;6(9):1425–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27375790>
151. Huang HB, Ge MJ. The Effects of Different Surgical Approaches on the Perioperative Level of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2016 Sep;64(6):515–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030121>
152. Huang T, Jia C-P, Jun-Yang, Sun W-J, Wang W-T, Zhang H-L, et al. Highly sensitive enumeration of circulating tumor cells in lung cancer patients using a size-based filtration microfluidic chip. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2014 Jan 15;51:213–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962709>